

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-521477

(P2003-521477A)

(43) 公表日 平成15年7月15日 (2003.7.15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	サーチコード (参考)
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/00		A 6 1 K 39/00	G 4 B 0 5 0
39/00			H 4 B 0 6 4
		A 6 1 P 25/28	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/28		43/00	4 C 0 8 4
			1 0 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2001-504406 (P2001-504406)
 (86) (22) 出願日 平成12年6月23日 (2000.6.23)
 (86) 翻訳文提出日 平成13年12月25日 (2001.12.25)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 1 7 4 5 5
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 0 7 8 3 4 4
 (87) 国際公開日 平成12年12月28日 (2000.12.28)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 4 0 , 6 3 4
 (32) 優先日 平成11年6月23日 (1999.6.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 カブリオン ファーマシューティカルズ
 インコーポレーティッド
 カナダ国 ケベック州 モントリオール
 ベア ストリート 5375 スイート 201
 (72) 発明者 キャッシュマン ネイル アール、
 カナダ国 オンタリオ州 トロント デネ
 ウッド サークル 1
 (72) 発明者 パラミシオティス ユスターシュ
 カナダ国 ケベック州 ブーシェルビル
 アルフレッド・ラリベルテ 208
 (74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリオン蛋白質ペプチドおよびその使用

(57) 【要約】

全般的に、本発明はPr^{Sc}に対して特異的な抗体、ならびにその診断、治療および汚染除去での利用に関する。本発明はまた、Pr^{Sc}に対して特異的な抗体を作製するための免疫原およびプリオン疾患を治療するための治療薬として有用な合成ペプチドを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳類PrP^{Sc}のYYXエピトープに対して高い結合親和性で結合する抗体またはその断片。

【請求項2】 抗体がPrP^{Sc}に実質的に結合しない、請求項1記載の抗体。

【請求項3】 抗体が哺乳類PrP^{Sc}のYYRエピトープに結合する、請求項1記載の抗体。

【請求項4】 抗体がPrP^{Sc}のYYRエピトープに対して作製されたポリクローナル抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項5】 YYXエピトープがCYRR (配列番号: 32)の一部である、請求項4記載の抗体。

【請求項6】 抗体がPrP^{Sc}のYYRエピトープに対して作製されたモノクローナル抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項7】 YYRエピトープが

CYYRRYYRY (配列番号: 33).

の一部である、請求項6記載の抗体。

【請求項8】 抗体がIgG、IgM、IgE、IgD、またはIgAである、請求項1記載の抗体。

【請求項9】 抗体断片がFabまたはFv断片である、請求項1記載の抗体。

【請求項10】 哺乳類PrP^{Sc}のYYXエピトープに対して高い結合親和性で結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株。

【請求項11】 抗体がPrP^{Sc}に実質的に結合しない、請求項10記載のハイブリドーマ。

【請求項12】 抗体が哺乳類PrP^{Sc}のYYRエピトープに結合する、請求項10記載のハイブリドーマ細胞株。

【請求項13】 YYRエピトープが

CYYRRYYRY (配列番号: 33).

の一部である、請求項12記載のハイブリドーマ細胞株。

【請求項14】 請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物。

【請求項15】 組成物が担体をさらに含む、請求項14記載の組成物。

【請求項16】 組成物が治療的組成物である、請求項14記載の組成物。

【請求項17】 請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体と該抗体を検出する手段とを含む免疫学試験キット。

【請求項18】 以下の段階を含む、生体試料中のPrP^{Sc}を検出する方法：

(a) 該生体試料を、抗体とPrP^{Sc}とのあいだに複合体が形成される条件で、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体と接触させる段階；および

(b) PrP^{Sc}が該生体試料中に存在する指標として該複合体を検出する段階。

【請求項19】 抗体がPrP^{Sc}に実質的に結合しない、請求項18記載の方法。

【請求項20】 抗体がポリクローナル抗体またはその断片である、請求項18記載の方法。

【請求項21】 抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、請求項18記載の方法。

【請求項22】 生体試料が、組織、細胞、組織抽出物、細胞抽出物、体液、または生検を含む、請求項18記載の方法。

【請求項23】 PrP^{Sc}がヒト、家畜種、またはペット種に由来する、請求項18記載の方法。

【請求項24】 複合体がELISA、RIA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、またはフローサイトメトリーを用いて検出される、請求項18記載の方法。

【請求項25】 薬学的に許容される担体において請求項1～9のいずれか一項に記載の有効量の抗体を哺乳類に投与する段階を含む、哺乳類におけるPrP^{Sc}疾患を治療または予防する方法。

【請求項26】 PrP^{Sc}としての抗原性を有する、YYX、YYR、YYD、またはYYQアミノ酸配列を含むペプチド。

【請求項27】 18個またはそれより少ない数のアミノ酸で構成される、請求項26記載のペプチド。

【請求項28】 12個またはそれより少ない数のアミノ酸で構成される、請求項26記載のペプチド。

【請求項29】 8個またはそれより少ない数のアミノ酸で構成される、請

求項26記載のペプチド。

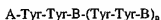
【請求項30】 5個またはそれより少ない数のアミノ酸で構成される、請求項26記載のペプチド。

【請求項31】 免疫原性担体と融合される、請求項26記載のペプチド。

【請求項32】 免疫原性担体が血清アルブミン、卵白アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、8map、またはライソザイムである、請求項26記載のペプチド。

【請求項33】 アミノ酸配列YYRを有するトリペプチドである、請求項26記載のペプチド。

【請求項34】 下記の式を有する合成ペプチド：



式中、Aは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；

Bは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；および

nは0から10までの数である。

【請求項35】 AおよびBの少なくとも1つがチロシンではない、請求項34記載のペプチド。

【請求項36】 AまたはBがアラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、またはトリプトファンより選択される、請求項34記載のペプチド。

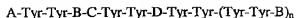
【請求項37】 A-Tyr-Tyr-Arg（配列番号：12）またはその薬学的に許容される塩である、請求項34記載のペプチド。

【請求項38】 A-Tyr-Tyr-Gln（配列番号：13）またはその薬学的に許容される塩である、請求項34記載のペプチド。

【請求項39】 A-Tyr-Tyr-Asp（配列番号：14）；またはその薬学的に許容される塩である、請求項34記載のペプチド。

【請求項40】 免疫学的担体に結合している、請求項34記載のペプチド。

【請求項41】 下記の式を有する合成ペプチド：



式中、Aは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；

Bは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；

Cは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；

Dは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；および

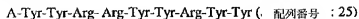
nは0から10までの数である。

【請求項42】 A、B、CおよびDの少なくとも1つがチロシンではない、請求項41記載のペプチド。

【請求項43】 A、B、CまたはDが、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、またはトリプトファンより選択される、請求項41記載のペプチド。

【請求項44】 Aが、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、またはトリプトファンであって、且つB、CおよびDが、アルギニン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、またはトリプトファンより選択される、請求項41記載のペプチド。

【請求項45】 ペプチドが、



またはその薬学的に許容される塩である、請求項41記載のペプチド。

【請求項46】 免疫学的担体に結合している、請求項41記載のペプチド。

【請求項47】 以下の段階を含む、哺乳類のPrP^{Sc}に対して高い結合親和性で結合する抗体を産生する方法：

(a) 二つまたはそれ以上のアミノ酸側鎖を有する接触性のエピトープを含む

プリオン蛋白質ペプチドを提供する段階；

(b) 段階 (a) の該プリオン蛋白質ペプチドによって哺乳類を免疫する段階；
および

(c) 該哺乳類の組織または該組織を用いて作製されたハイブリドーマから該抗体を精製する段階。

【請求項48】 抗体がPrP^{Sc}に実質的に結合しない、請求項47記載の方法。

【請求項49】 抗体がポリクローナル抗体またはその断片である、請求項47記載の方法。

【請求項50】 抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、請求項47記載の方法。

【請求項51】 プリオン蛋白質ペプチドがYYXアミノ酸配列を含む、請求項47記載の方法。

【請求項52】 プリオン蛋白質ペプチドが、YYR、YYQ、またはYYDアミノ酸配列を含む、請求項51記載の方法。

【請求項53】 プリオン蛋白質ペプチドが18個またはそれより少ない数のアミノ酸で構成される、請求項47記載の方法。

【請求項54】 プリオン蛋白質ペプチドが12個またはそれより少ない数のアミノ酸で構成される、請求項47記載の方法。

【請求項55】 プリオン蛋白質ペプチドが8個またはそれより少ない数のアミノ酸で構成される、請求項47記載の方法。

【請求項56】 プリオン蛋白質ペプチドが5個またはそれより少ない数のアミノ酸で構成される、請求項47記載の方法。

【請求項57】 プリオン蛋白質ペプチドが請求項34または41記載のペプチドを含む、請求項47記載の方法。

【請求項58】 請求項26、34、または41のいずれか一項に記載のペプチドと、薬学的に許容される担体とを含む、PrP^{Sc}疾患に対するワクチン。

【請求項59】 請求項58記載の有効量のワクチンを投与する段階を含む、PrP^{Sc}疾患に対して哺乳類を免疫する方法。

【請求項60】 請求項26～46のいずれか一項に記載のペプチドを含む組成

物。

【請求項61】 組成物が治療的組成物である、請求項60記載の組成物。

【請求項62】 以下の段階を含む、生体試料からPrP^{Sc}の汚染を除去する方法：

- (a) 生体試料を、抗PrP^{Sc}抗体：PrP^{Sc}複合体が形成されるために十分な期間、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体によって処理する段階；および
- (b) 該生体試料から該抗PrP^{Sc}抗体：PrP^{Sc}複合体を回収する段階。

【請求項63】 生体試料が組織、体液、または臓器である、請求項62記載の方法。

【請求項64】 生体試料が抗体によって灌流される、請求項62記載の方法。

【請求項65】 以下の段階を含む、生体試料においてPrP^{Sc}を阻害する方法：

生体試料を、抗PrP^{Sc}抗体：PrP^{Sc}複合体が形成されるために十分な期間、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体によって処理する段階。

【請求項66】 生体試料が体液、組織、または臓器である、請求項65記載の方法。

【請求項67】 生体試料が抗体によって灌流される、請求項65記載の方法。

【請求項68】 プリオン疾患を治療するための候補化合物を同定する方法であって、

- (a) 試験化合物の存在下でPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合を測定する段階と、
- (b) 該試験化合物の非存在下で、PrP^{Sc}に対する該抗YYX抗体の結合を測定する段階とを含み、

該試験化合物の存在下でのPrP^{Sc}に対する該抗YYX抗体の結合レベルが、試験化合物の非存在下でのPrP^{Sc}に対する該抗YYX抗体の結合レベルより低い場合に、該試験化合物がプリオン疾患を治療するための治療用化合物である可能性を有することが示される方法。

【請求項69】 抗YYX抗体が、抗YVR抗体、抗YYD抗体、または抗YYQ抗体である、請求項68記載の方法。

【請求項70】 プリオン疾患がヒト、家畜動物種、またはペット種で発症する、請求項68記載の方法。

【請求項71】 プリオン疾患がヒト、ウシ、ヒツジ、またはヤギで発症する、請求項68記載の方法。

【請求項72】 試験化合物が低分子である、請求項68記載の方法。

【請求項73】 請求項68記載の方法に従って同定された化合物。

【請求項74】 プリオン疾患を診断するための化合物を同定する方法であって、

(a) 試験化合物の存在下でPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合を測定する段階と

(b) 該試験化合物の非存在下で、PrP^{Sc}に対する該抗YYX抗体の結合を測定する段階とを含み、

該試験化合物の存在下でのPrP^{Sc}に対する該抗YYX抗体の結合レベルが、試験化合物の非存在下でのPrP^{Sc}に対する該抗YYX抗体の結合レベルより低い場合に、該試験化合物がプリオン疾患を診断するための治療用化合物である可能性を有することが示される方法。

【請求項75】 抗YYX抗体が、抗YVR抗体、抗YYD抗体、または抗YYQ抗体である、請求項74記載の方法。

【請求項76】 プリオン疾患がヒト、家畜動物種、またはペット種で発症する、請求項74記載の方法。

【請求項77】 プリオン疾患がヒト、ウシ、ヒツジ、またはヤギで発症する、請求項74記載の方法。

【請求項78】 試験化合物が低分子である、請求項74記載の方法。

【請求項79】 請求項74記載の方法に従って同定された化合物。

【請求項80】 請求項74記載の方法に従って産生された抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

本発明は、PrP^{Sc} 特異的抗体およびその作製に用いられるペプチドに関する。これらの抗体は試料中のPrP^{Sc}を検出するために、そしてPrP^{Sc}を精製するために適している。さらに、本発明は、PrP^{Sc}を検出するための診断補助剤、PrP^{Sc} 特異的立体構造エпитープを含むまたは模倣する薬剤、およびプリオン汚染を除去する方法に関する。

【0002】

プリオンは、海綿状変化（例えば、脳の微小空洞形成、通常、灰白質に多い）、神経細胞喪失、神経の喪失と不釣り合いな星状細胞増殖、および異常なアミロイド原性蛋白質の蓄積を特徴とする神経変性症候群に関連する感染物質である。プリオン疾患における神経変性は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、およびパーキンソン病のような他のより一般的な神経変性症候群と、特定の基礎となるメカニズムを共有する可能性がある。

【0003】

これらの疾患を伝播する物質は、感染材料において核酸成分に関する化学または物理的証拠が再現よく検出されないという点において、ウイルスおよびウイロイドとは著しく異なる（プルジナー（Prusiner）、Science 216:136~144、1982）。プリオンとそれらが引き起こす疾患の研究における主な段階は、プリオン蛋白質（PrP）と呼ばれる蛋白質の発見と精製である（ボルトン（Bolton）ら、Science 218:1309~11、1982；プルジナー（Prusiner）ら、Biochemistry 21:6942~50、1982；マッキンレー（McKinley）ら、Cell 35:57~62、1983）。プロテナーゼ消化を用いて精製すると、27~30 kDのプロテナーゼ抵抗性の蛋白質がスクレイビーに罹患したハムスターの脳から発見され、PrP27-30と名付けられたが、これは後にPrP^{Sc}の断片であることが判明した（ボルトン（Bolton）ら、Science 218:1309~1311、1982）。

【0004】

プリオンの仮説によれば、プリオンの感染性はPrP^{Sc}に存在する。PrP^{Sc}は、感

染性に少なくとも強く関連しており、プリオン感染症の信頼できる代用物質であると思われる。PrP^{Sc}は、PrP^Cと呼ばれる宿主がコードする細胞蛋白質の立体構造変種であり（オエシュ（Oesch）ら、Cell 40 : 735~746, 1985）、これは、分子量33~35 kDのグリコシルフォスファチジルイノシトール（GPI）結合細胞表面蛋白質である。

【0005】

PrP^Cは、正常な脳から単離されており、プロテアーゼ感受性であって、スクレイビー疾患発生活性とは関連しないことが判明した（ベンドハイム（Bendheim）ら、Ciba Found. Symp. 164~177, 1988）。プリオンの理論に従えば、PrP^Cは、PrP^{Sc}に自動触媒的に変換される（プルジナー（Prusiner）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 13363~83, 1998）。より最近、PrP^Cは、インビトロでPrP^{Sc}によってプロテアーゼ抵抗型に変換されうると報告された（コシスコ（Kocisko）ら、Nature 370 : 471~473, 1994）。PrP^Cは、実際の生物学的または生理学的機能が不明である進化的に保存された膜蛋白質である。PrP^Cを欠損するマウスは、生存して、神経学的および身体的な障害の明白な兆候を示さない（ビューラー（Bueler）ら、Nature 356 : 577~582, 1992）。さらに、これらのマウスはプリオン感染に対して感受性がなく、感染性の複製におけるPrPの中心的重要性を強調する（ビューラー（Bueler）ら、Cell 73 : 1339~1347, 1993；プルジナー（Prusiner）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 10608~10612, 1993）。PrPノックアウトマウスを標的とした研究から、シナプス機能の障害（コリンジ（Collinge）ら、Nature 370 : 295~297, 1994）および睡眠調節の変化（トブラー（Tobler）ら、J. Neurosci. 17 : 1869~79）が判明した。その上、PrP^Cは、コンカナバリンA刺激によって誘導されるT細胞活性化を修飾することが示されており（キャッシュマン（Cashman）ら、Cell 61 : 185~192, 1990）、このことは、この蛋白質の機能的役割を示している。

【0006】

プリオン疾患は、急速に進行する致死性の治療不可能な神経変性症候群である。ヒトプリオン疾患には、散発性、医原性、および家族性型があるクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、ならびにウシ海綿状脳症の原因物質に汚染された畜牛

組織の消費に由来する可能性がある変異型CJD（「vCJD」）が含まれる（キャッシュマン（Cashman）、Can. Med. Assoc. J. 157:1381～5、1997において論評）。CJDは、汚染された死体下垂体ホルモン、硬膜移植、神経外科器具、および角膜移植によってヒトからヒトへ偶発的に伝播している（ブラウン（Brown）ら、Lancet 340:24～7、1992）。血液および血液製品を通じてCJDが伝播するリスクは、世界中の懸念である。その上、ヒツジおよびヤギにおけるスクレイピーは一般的であり、イギリスにおけるウシ海綿状脳症（BSE）と同様に、北米では経済的に重要なプリオン関連疾患である。英国農業漁業食品省によれば、おそらく感染物質を保有する年齢であると思われる畜牛4,347,380頭以上が殺処分されている。農業省は流行の全体的な損失は、2002年までに71億3000万ポンドに達するであろうと推定している。イギリス全土からウシ173,000頭以上の感染が確認され、何百何千頭ものウシが検出されないまま食品流通に入った可能性がある。

【0007】

さらに、アメリカとカナダは現在、BSE流行の初期およびピーク年のあいだにイギリスに滞在した人の献血の一時保留を実施している。そのような制限は、vCJDを伝播するリスクに対する予防策として採用されているが、vCJDは、1996年以降今日までイギリス人60人以上が罹患している。カナダの血液局は、その現役のドナー600,000人中120,000人、即ち22%が1980年以降イギリスを訪問したと推定している（モントリオールガゼット、1999年5月6日号）。その損失を埋めるために新しいドナーが多く募集され、いくつかの懸念を生じている。そのような懸念の一つは、新しいドナーの血液は、肝炎およびヒト免疫不全ウイルスのような疾患に関するスクリーニングが一度に過ぎないために、安全ではないという点である。

【0008】

したがって、プリオン感染血液または疾患を大量にスクリーニングするために適した診断方法が必要である。したがって、PrP^CをPrP^{Sc}と区別する抗体を利用することは、プリオン疾患の検査を開発するために非常に重要であろう。さらに、プリオン疾患を予防および／または治療する治療物質も必要である。

【0009】

発明の概要

本明細書において述べるように、PrP^{Sc}のYYX連続エピトープは、PrP^{Sc}に対して特異的な抗体を産生するために有用であることを示す証拠が存在する。特に、本発明者らは、PrP配列からの短い連続的な合成ペプチドを利用する免疫プロトコールによって、PrP^{Sc}に対して特異的な高親和性ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体が産生されることを証明した。その上、そのような抗体はまた、PrP^{Sc}との検出可能な反応性がないことも認められた。一つの例において、PrP^{Sc}からPrP^{Sc}への立体構造変化の分子モデリング分析に基づいて、蛋白質のPrP^{Sc}イソ型の分子表面上で溶媒接触性である配列を予測するYYR配列を含むペプチドを選択した。

【0010】

したがって、本発明は、哺乳類PrP^{Sc}の連続YYXエピトープに対して高い結合親和性で結合するエピトープ特異的抗PrP抗体またはその断片を特徴とする。好ましくは、抗体は、哺乳類PrP^{Sc}のYYRエピトープ；YYQエピトープ；またはYYDエピトープに結合する。好ましい態様において、抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。そのような抗体には、IgG、IgM、IgE、IgD、またはIgA抗体と共に、Fab断片またはFv断片のような断片が含まれる。そのような抗PrP抗体は特定のPrP^{Sc}エピトープに対して作製することが都合がよい。さらに、PrP^{Sc}に結合する抗体を用いて、標準的な診断アッセイ法においてPrP^{Sc}を定量することができる。

【0011】

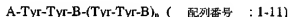
なおさらに関連する局面において、本発明は、感染疾患特異的プリオンを診断するための免疫学的検出技法にエピトープ特異的抗PrP抗体を用いることを特徴とする。PrP^{Sc}と特異的に反応する抗PrP抗体は、本明細書に説明するように、適当に適合させたPrPペプチドを用いることによって調製することができる。本発明は特に、PrPペプチド、および／またはエピトープ特異的抗PrP抗体を含む診断補助剤に関する。さらに、本発明は、疾患特異的プリオン蛋白質に選択的に結合して正常なプリオン蛋白質には結合しない抗体に関する。

【0012】

もう一つの局面において、本発明は、配列チロシン-チロシン-アルギニン (YYR) を有するプリオン蛋白質ペプチドを特徴とする。好ましくは、ペプチドは、ペプチドをより免疫原性にして、高親和性抗PrP^{Sc}抗体の調製を可能にする担体に結合するトリペプチドである。そのようなトリペプチドの合成を本明細書に記載する。本発明に従って、そのような短いペプチド (例えば、YYR、YYQ、またはYYDペプチド) は、プリオン蛋白質のPrP^{Sc}イソ型において接触性であるが、正常なPrP^Cイソ型では接触性でなく、および/または抗体検出を可能にするようにPrP^{Sc}において集合している決定因子を表す。例えば、YYRトリペプチドは3つのプリオン蛋白質エピトープの2つの中に含まれる; しかし、このトリペプチドは、PrP^{Sc}免疫反応性の特異的根拠としてこれまでに同定されていない。その上、そのような配列は、ウシ、ヒト、ヒツジ、マウスおよびハムスターを含むがこれらに限定されない多くの種に対して高度に保存されている (図2)。

【0013】

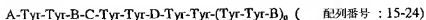
さらにもう一つの局面において、本発明は下記の式を有する合成ペプチドを特徴とする:



式中、Aは任意のアミノ酸であるか、または存在せず; Bは任意のアミノ酸であるか、または存在せず; およびnは0から10までの数である。好ましい態様において、AおよびBの少なくとも1つはチロシンではない。他の好ましい態様において、AまたはBは、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、またはトリプトファンから選択される。他の好ましい態様において、ペプチドは免疫学的担体に結合している。そのようなペプチドには、A-Tyr-Tyr-Arg (配列番号: 12); A-Tyr-Tyr-Gln (配列番号: 13); A-Tyr-Tyr-Asp (配列番号: 14); またはそのいかなる薬学的に許容される塩も含まれるがこれらに限定されることはない。

【0014】

さらにもう一つの局面において、本発明は、下記の式を有する合成ペプチドを特徴とする。



式中、Aは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；Bは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；Cは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；Dは任意のアミノ酸であるか、または存在せず；および n は0から10までの数である。好ましい態様において、A、B、CまたはDの少なくとも1つはチロシンではない。他の好ましい態様において、A、B、CまたはDは、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、またはトリプトファンから選択される。さらに他の好ましい態様において、Aは、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、またはトリプトファンから選択され、B、CおよびDは、アルギニン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、またはトリプトファンから選択される。例としてのペプチドには



またはその薬学的に許容される塩が含まれるがこれらに限定されることはない。他の態様において、ペプチドは免疫学的担体に結合している。

【0015】

もう一つの局面において、本発明は、以下の一つまたはそれ以上を含む、PrP^{Sc}としての抗原性を有する短い合成プリオンペプチド（例えば、アミノ酸3～10個、またはアミノ酸4～12個まで）に関する：マウスPrPのT189～193に認められるトレオニン四反復、またはヒト、ヒツジ、ヤギ、もしくはウシPrPの対応するアミノ酸残基；マウスPrPのM128、M133、もしくはM153アミノ酸残基、またはヒト、ヒツジ、ヤギ、もしくはウシPrPの対応するアミノ酸残基；マウスPrPのH186

アミノ酸残基またはヒト、ヒツジ、ヤギ、もしくはウシPrPの対応するアミノ酸残基；マウスPrPのQ159、Q167、Q185、もしくはQ216アミノ酸残基、またはヒト、ヒツジ、ヤギ、もしくはウシPrPの対応するアミノ酸残基；マウスPrPのN158アミノ酸残基、またはヒト、ヒツジ、ヤギ、もしくはウシPrPの対応するアミノ酸残基；マウスPrPのM128、M133、もしくはM153アミノ酸残基、またはヒト、ヒツジ、ヤギ、もしくはウシPrPの対応するアミノ酸残基；マウスPrPのL124もしくはL129アミノ酸残基、またはヒト、ヒツジ、ヤギ、もしくはウシPrPの対応するアミノ酸残基；またはマウスPrPのI181もしくはI183アミノ酸残基、またはヒト、ヒツジ、ヤギ、もしくはウシPrPの対応するアミノ酸残基。

【0016】

本発明のペプチドは、当技術分野で既知の方法に従って化学合成によって調製することができる。

【0017】

さらに、本発明のPrPペプチドは、エピトープ特異的抗PrP^{Sc}抗体を調製するために用いることができる。特に、本発明のペプチドは、非常に純粋な物質であるという長所を提供し、例えば、免疫沈降、ELISA、およびフローサイトメトリーのような標準的な免疫学的アッセイ法においてPrP^{Sc}を検出するために用いることができる抗PrP抗体の調製に適している。本発明のPrPペプチド（例えば、YYR）は、ポリクローナルエピトープ特異的抗PrP^{Sc}抗体（抗血清）およびモノクローナルエピトープ特異的抗PrP抗体の双方を調製するために用いることができる。これらの抗体は、当技術分野で既知の標準的な方法によって調製され、好ましくは抗体を産生するための担体材料と結合している。

【0018】

その上、YYXのPrP^{Sc}特異的暴露を利用する化合物を合理的にデザインしてもよく、またはYYXと抗YYX抗体との相互作用を模倣する化合物をコンビナトリアルライブラリーから得ることができる。これらの化合物は、プリオン診断において、またはプリオン疾患の治療として有用である。

【0019】

もう一つの局面において、本発明は、本発明のPrPペプチドもしくは構造的に

関連する化合物、またはポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を薬学的担体中に含む、プリオン疾患を治療および予防するための薬学的調製物を特徴とする。そのような薬剤は、本発明のPrPペプチドまたはエピトープ特異的抗PrP抗体を含む。

【0020】

望ましければ、本発明のペプチドおよび抗体は、薬学的に許容される塩の形で提供されうる。好ましい塩の例は、治療的に許容される有機塩、例えば、酢酸、乳酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、サリチル酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、またはパモン酸と共に、タンニン酸もしくはカルボキシメチルセルロースのような重合酸、および塩酸のようなハロゲン化水素酸、硫酸もしくは磷酸のような無機酸の塩である。本発明のペプチドまたは抗体は、従来の方法の一つにおいて（例えば、経口、非経口、経皮、または経粘膜）、生体分解性の生体適合性ポリマーを用いる徐放性製剤において、またはミセル、ゲル、およびリポソームを用いることによって、哺乳類、特にヒトに投与してもよい。

【0021】

さらにもう一つの局面において、本発明は、動物（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、またはネコ）におけるプリオン疾患を治療または予防する方法を特徴とする。一つの好ましい態様において、本方法は、PrP^{Sc}からPrP^{Se}への変換を阻害するか、PrP^{Se}:PrP^{Sc}凝集体形成を阻害するか、またはPrP^{Sc}からPrP^{Se}への集合を阻害する、エピトープ特異的抗PrP抗体もしくはPrPペプチドの治療的有效量を動物に投与することを含む。PrPペプチドはまた、PrP^{Se}に対して特異的な宿主抗体の産生を刺激することによって、プリオン疾患に対して宿主を免疫するために用いてもよい。

【0022】

関連する局面において、本発明は、生体試料においてPrP^{Se}を検出する方法およびキットを特徴とする。

【0023】

さらにもう一つの局面において、本発明は、生体試料においてPrP^{Se}汚染を除

去する方法およびキットを特徴とする。好ましい態様において、方法は以下の段階を含む：(a) 生体試料をポリクローナルまたはモノクローナル抗体（またはその断片もしくは類似体）によって処理し、処理によって抗体：PrP^{Sc}複合体が形成される段階；および(b) 抗体：PrP^{Sc}複合体を生体試料から回収する段階。そのような汚染除去技法はまた、PrP^{Sc}を除去または不活化するために生体試料を抗体（またはその断片もしくは類似体）によって灌流する方法を用いることを含んでもよい。

【0024】

もう一つの局面において、本発明は、プリオン疾患を治療する化合物を同定する方法を特徴とする。方法は、(a) 試験化合物の存在下でPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合を測定する段階；および(b) 試験化合物の非存在下でPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合を測定する段階を含み；試験化合物の存在下でのPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合レベルが、試験化合物の非存在下でのPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合レベルより低い場合に、試験化合物が、プリオン疾患を治療するための治療用化合物である可能性を有することを示している。好ましくは、抗YYX抗体は、抗YYR抗体、抗YYD抗体、または抗YYQ抗体である。

【0025】

もう一つの局面において、本発明は、プリオン疾患を診断するための化合物を同定する方法を提供する。方法は、(a) 試験化合物の存在下でPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合を測定する段階；および(b) 試験化合物の非存在下でPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合を測定する段階を含み；試験化合物の存在下でのPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合レベルが、試験化合物の非存在下でのPrP^{Sc}に対する抗YYX抗体の結合レベルより低い場合に、試験化合物が、プリオン疾患を診断するための化合物である可能性を有することを示している。

【0026】

関連する局面において、本発明は、上記の方法のいずれかによって同定された治療用化合物および診断用化合物を特徴とする。

【0027】

「高い結合親和性」とは、親和性定数が10 μ M未満、好ましくは1 μ M未満、よ

り好ましくは100 nM未満、および最も好ましくは10 nM未満での結合を意味する。

【0028】

「プリオン疾患」とは、プリオン媒介性の急速に進行する致死性で治療できない脳変性障害群を意味し、ヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、変異型CJD、医原性CJD、家族性CJD、クールー、ゲルストマン・ストラウスラー症候群、および致死性家族性不眠症(プルシナー (Prusiner)、Science 252:1515~1522, 1991)、ヒツジおよびヤギにおけるスクレイピー、ならびにウシにおける海綿状脳症と共に、他の反芻類およびネコにおける最近記述されているプリオン疾患を含むがこれらに限定されることはない。

【0029】

「プリオン疾患の治療」とは、プリオン疾患に関連した任意の症状、特に海綿状の変化、神経細胞喪失、星状細胞増殖、PrP^{Sc}蛋白質の蓄積、痴呆、または死亡に至る症状の発現を減少、予防、安定化、または遅延させることを意味する。

【0030】

「精製抗体」とは、それが天然で会合する蛋白質および天然に存在する有機分子を含まない重量で少なくとも60%の抗体を意味する。好ましくは調製物は、重量で少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%の抗体、例えばYYX特異的抗体(例えば、YYR-、YYQ-、またはYYD-特異的抗体)である。精製抗体は、例えば、基質結合YYXと標準的な技法を用いるアフィニティクロマトグラフィーによって得てもよい。

【0031】

「YYX」とは、配列チロシン-チロシン-Xを有するペプチドを意味し、式中、Xは任意のアミノ酸である。「YYR」は、配列「チロシン-チロシン-アルギニン」を有するペプチドを意味する。「YYQ」は、配列「チロシン-チロシン-グルタミン」を有するペプチドを意味する。「YYD」は、配列「チロシン-チロシン-アスパラギン酸」を有するペプチドを意味する。

【0032】

「治療的組成物」とは、動物、例えばヒト、家畜種(例えば、ウシ、ヤギ、ブ

タ、もしくはヒツジ)のような哺乳類、またはペット種に投与するために適当な組成物を意味する。

【0033】

「低分子」とは、分子量が10,000ダルトンより小さいまたはそれに等しい、好ましくは1000ダルトンより小さいまたはそれに等しい、および最も好ましくは500ダルトンより小さいまたはそれに等しい化合物を意味する。

【0034】

本発明の他の特徴および長所は、その好ましい態様に関する以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなると思われる。

【0035】

発明の詳細な説明

本発明者らは、PrPの一つまたはそれ以上の部位におけるYYXエピトープ（例えば、YYR）のチロシンの選択した芳香族側鎖の方向が、PrP^{Sc}の分子表面に対して特異的な連続的免疫エピトープを定義することを証明したが、公表されたPrP^C NMR構造解析によれば（リーク（Riek）ら、Nature 382:180、1996；ドネ（Donne）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13452~7、1997；ザーン（Zahn）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:145~50、2000）、同じチロシン側鎖がPrP^C立体構造では接触性でないことが知られている。この発見によって、診断および治療目的のために用いてもよいPrP^{Sc}特異的抗体の産生のみならず、プリオンとその関連疾患および障害を検出または治療するために有用な新規化合物のスクリーニングの開発が促進される。

【0036】

PrP^{Sc}に対するエピトープ特異的抗体の産生

抗体は、独自のアミノ酸決定因子またはエピトープによって蛋白質を特異的に認識する。これらの決定因子またはエピトープは、直鎖状のアミノ酸配列であるか、または三次元空間においてアミノ酸によって形成される明確な立体構造である可能性がある。PrP^CからPrP^{Sc}への変換が、蛋白質の立体構造に大きい変化を伴うことを考慮すれば、変換によって独自のエピトープが形成される、または出現する可能性がある。したがって、本明細書において記載するように、本発明者

らはプリオン蛋白質変換に関するいわゆる側鎖仮説を展開した。このスキームによれば、PrP^Cの溶媒非接触性の内部構造に通常封鎖されている側鎖は、PrP^{Sc}では溶媒接触性である可能性がある。したがって、安定なPrP^{Sc}様中間体における疎水性残基の溶媒に対する暴露が増加していることから示されるように、新たに暴露された側鎖の多数が疎水性であると予想される (スウィートニッキ (Swietnicki) ら, J. Biol. Chem. 272: 27517~20, 1997)。これらの疎水性側鎖の突出は、単独またはPrP^Cの分子表面に通常存在する他の側鎖と組み合わせさせて、PrP^{Sc}の抗体認識に関する独自のエピトープの基礎を形成する。その上、これらの表面接触性の疎水性側鎖は、PrP^{Sc}の溶解度と凝集特徴を変化させると予想され、この構造的イソ型についてすでに知られている特性と釣り合う。新たな接触性側鎖も同様に、PrP^CからPrP^{Sc}への集合プロセスに関与する可能性がある。

【0037】

この仮説を調べることは、その情報が蛍光分光試験によって得られる、2つの疎水性アミノ酸側鎖であるトリプトファンとチロシン環の方向を調べることによってインビトロで開始した。第一に、PrP^CからPrP^{Sc}への変換の特徴を示す構造変化をモデルとするために、マウス組換え型PrP^Cのβシート転移を低いpHによって誘導した (ホルネマン&グロックシュバー (Hornemann and Glockshuber)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6010, 1998)。図1Aは、pH 7.0から3.0の円偏光二色性による分子構造的シフトを示し、これはPrP^Cの優勢なαヘリックスから優勢なβシートへの変化と一致する (適当なそれぞれの周波数での二重から一重最小値へのスペクトルのシフト)。

【0038】

第二に、組換え型PrP^Cにおけるチロシンとトリプトファン側鎖のpH滴定による溶媒接触性を、標準的な蛍光分光法を用いて調べた (図1B)。この試験は他のアミノ酸側鎖に隣接する (すなわち、蛋白質の内部構造において) 芳香族側鎖が、水に暴露された芳香族側鎖とは異なる特異的蛍光を有するという原理に基づいている (例えば、チン (Chin) ら, Biochemistry 31: 1945~51, 1992)。組換え型マウスPrP^Cを低いpHに供すると、トリプトファンとチロシン芳香族基は、異なる溶媒暴露と一致して反対の挙動を示した。

【0039】

ヒト、ウシ、およびマウスPrP^Cのアミノ酸配列を調べると、チロシン残基13個が明らかになった(図2)。ヒトとウシPrPにおけるチロシン11個と、マウスPrPにおける10個は、蛋白質のC末端2/3に含まれ、これはプリオンの感染性にとって必要かつ十分であるプロテアーゼ抵抗性構造ドメインを含む。注目すべきことは、このドメインにおけるチロシン6個は、異常な「YY」対モチーフに存在する点である(図2)。3つの対の2つは、C-末端アルギニン(R)と結合するが、第三のYYモチーフは、マウスおよびハムスターではC-末端のアスパラギン酸(D)と結合しており、またはウシ、ヒツジ、およびヒトではグルタミン(Q)に結合している。Rは、末端グアニド基を含むが、QおよびDは、カルボキサミドおよびカルボニル結合を含み、これらは平面である。YYモチーフにおけるそのような末端の平面アミノ酸は、暴露されたチロシン環と相互作用して、免疫認識にとってそれらを安定化させ、または安定にする可能性がある。

【0040】

さらに、マウス、ハムスター、およびヒトPrP^CのNMR解析構造を調べると、同定されたチロシン対のいずれも、分子表面上で接触性の直交縦列立体配置において双方の環の方向を有しないことが判明した(リーク(Riek)ら、Nature 382: 180、1996; ドネ(Donne)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13452、1997; ザーン(Zahn)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 145~50、2000)(図3)。酸処理したPrP^CまたはPrP^{Sc}の表面上のチロシンの暴露の増加が、チロシン対のいくつかに関連していると推測することは妥当である。チロシン環の一つの安定な立体構造はパイスタッキング(pi-stacking)と呼ばれ、この場合、2つの環がわずかにずれて平行となるように積み重ねられる(図4に略図で示す)。安定であるが、チロシン環に接触性であるパイスタッキングされた表面に関して構造データベースを予備的に検索したところ、類似の方向を有する他の蛋白質は4個同定されたに過ぎず、そのいずれも膜蛋白質のエクトドメインに存在しない。したがって、新規PrP^{Sc}-特異的エピトープは、アルギニン、グルタミン、およびアスパラギン酸の関与によって、またはそれらの関与なく、パイスタッキング方向におけるチロシン対であると考えられる(これらは、平面であり、同様に、そ

の先行するチロシンとのバースタッキング相互作用に關与する可能性がある)。

【0041】

PrP^{Sc}におけるチロシン側鎖の方向の変化の他に、同様に、3つのY₂Rモチーフは、互いにその近位性がシフトするために、PrP^{Sc}においてより免疫学的に接触性となる可能性がある。典型的なIgG抗体は、フレキシブルなヒンジ領域によって1つの定常領域に結合されている2つの同一の抗原結合領域を含む。PrP^CからPrP^{Sc}への立体構造の変化のあいだに、Y₂Rモチーフはおそらく互いに相対的に移動して(コース(Korth)ら、Nature 390:74~77, 1997)、相対的に離れている場所から相対的に近い場所に移動する。さらに、PrP^CにおけるY₂RモチーフのIgG認識は、2つの重要なモチーフが分子の異なる面に存在するために不都合となる可能性があり、そのため認識は、双方のIgG抗原結合領域が認識に關与している高結合力相互作用よりむしろ結合力の低い単価特性となる。

【0042】

ウシPrP^{Sc}およびPrP^{Sc}での本発明者らのデータは、抗Y₂R抗体が、免疫沈降およびELISAの試験によってPrP^{Sc}を特異的に認識すること(下記参照)を示し、このことは、PrP^{Sc}におけるチロシン側鎖の接触性の変化および/またはY₂Rモチーフの近位性と一致する。アミノ酸残基アルギニンも同様に、Y₂R抗体の産生および認識特性において重要であると思われる。極性のチロシン側鎖とアルギニンの非常に塩基性の側鎖との静電氣的相互作用は、Y₂Rトリペプチドによる免疫と、誘導された抗体によるPrP^{Sc}の認識の双方においてY₂Rペプチドの性質に關与する。末端のPrPループにおける第三のYY二量体モチーフは、いくつかの種(ヒトおよびウシを含む)においてグルタミンに關連していることは顕著であり、これはアルギニンによる部分的に保存的な置換であり、およびいくつかの他の種(マウスおよびハムスターを含む)ではアスパラギン酸による置換であるが、これは保存的置換ではない。平面側鎖を有する例としてのアミノ酸には、アルギニン、アスパラギン酸、およびグルタミンが含まれる。

【0043】

PrP^CからPrP^{Sc}への立体構造の変換に付带的なアミノ酸側鎖の暴露現象は、チロシン対に独自に当てはまらない可能性がある。大型(bulky)側鎖を有する他

のアミノ酸は、これらの側鎖がPrP^{Sc}の中心においてあまり認識されないことが判明する可能性があり、そしてこれらの側鎖は、単独または他の局所部分と組み合わせ、PrP^{Sc}の独自の免疫反応性の基礎を形成する可能性がある。PrP^EとPrP^{Sc}のあいだで異なる免疫学的エピトープは、PrP^{Sc}の診断試験の基礎となり、同様に、プリオン疾患に対するヒトおよび動物の治療および免疫において有用である。疎水性側鎖の暴露は、PrP^Eと比較すると、PrP^{Sc}の疎水性の増加および凝集の増強に関係すると考えられる。

【0044】

PrP^Eにおいて溶媒非接触性の大型側鎖の例には、以下のものが含まれる（アミノ酸残基は、マウスPrP配列に従って番号をつけている）：

1. Y127、Y156、Y217を含むYYXモチーフに含まれないチロシン。
2. 部分的に溶媒に暴露されていないトレオニン四反復、T189～193。
3. ヒスチジンH186。
4. グルタミンQ159、Q167、Q185、Q216。
5. アスパラギンN158。
6. メチオニンM128、M133、M153。
7. ロイシンL124、L129。
8. イソロイシンI181、I183。

【0045】

下記のように、YYRエピトープを含むペプチドを合成した。これらのペプチドを担体と結合して、これを用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を産生するためにウサギまたはマウスを免疫した。次に、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のPrP^{Sc}に対する特異性を調べた。結果は、そのような抗体がPrP^{Sc}に対して高い結合親和性で特異的に結合することを示した。

【0046】

以下に記載する実施例は、本発明を説明する目的で提供されるのであって、制限するものとして解釈してはならない。

【0047】

PrP^{Sc}特異的抗体

ポリクローナル抗血清、pAbC2を、KLHに結合したYYRペプチドに対してウサギにおいて作製した。血清を免疫レジメの後に各ウサギから採取して、総IgGをブロテインAカラムを用いて精製した。次に、これらの試料の抗PrP^{Sc}活性を、正常またはスクレイビー感染マウスからの脳ホモジネートを用いた免疫沈降反応において調べた。これらの試験において用いられた脳ホモジネートの初回分析から、正常な脳抽出物においてPrP^C (図5、レーン1) が、そして感染試料においてPrP (図5、レーン3) が検出可能な量で存在することが判明した。予想されたように、PrP^C は、プロテナーゼK (PK) (図5、レーン2) による消化に対して感受性があつたのに対し、PrP^{Sc} ではPK消化を行うと、プロテナーゼ抵抗性中心 (PrP 27~30と呼ばれる) の特徴的な移動シフトが明らかとなった (図5、レーン4)。これらの脳ホモジネートをBSAカップリングした磁気ビーズと共にインキュベートしたところ、いかなる検出可能なPrPも沈殿しなかったのに対し (図5、レーン5~8)、試料を6H4 (PrP特異的のモノクローナル抗体) とカップリングしたビーズと共にインキュベートすると、正常な脳からPrP^C (図5、レーン9)、そして感染した脳からPrP^{Sc} (図5、レーン11) およびPrP27-30 (図5、レーン12) が免疫沈降した。pAbC2 IgGをビーズにカップリングして、正常な脳ホモジネートと共にインキュベートしても、検出可能なPrPは免疫沈降しなかった (図6、レーン9および10)。顕著に、pAbC2 IgGカップリングビーズを感染試料と共にインキュベートすると、PrP^{Sc} (図6、レーン11) およびPrP 27~30 (図6、レーン12) を免疫沈降した。再度、PrP^C とPrP^{Sc} の検出可能な量 (図6、レーン1~4) を有するこれらの組織と、BSAカップリングしたビーズは、いかなるPrPも免疫沈降できなかった (図6、レーン5~8)。

【0048】

さらに、類似の実験によって、pAbC2 IgGが、6H4と比較してBSE感染脳からのウシPrP^{Sc} を特異的に免疫沈降させることが示された (図7)。その上、pAbC2抗体は、可溶性PC2を捕獲試薬として用いたELISA系においてウシPrP^{Sc} を認識するが、組換え型ウシPrP^C をプレートに直接吸着させるELISA試験では、6H4モノクローナル抗体を用いたその検出可能性にもかかわらず、シグナルを生じない (図16)。抗YYR IgGは、下記により詳細に示すマウス抗YYRモノクローナル抗体によ

る試験と同様に、ウェスタンブロッティングにおいて変性組換え型ウシPrP^cを認識しない（データは示していない）。

【0049】

ヤギポリクローナル抗血清も同様に、KLHに結合したYYRに対して作製した。血清を採取して、総IgGを硫酸アンモニウム沈殿によって単離した。YYR反応性IgGも同様に、YYR結合カラムを用いるアフィニティクロマトグラフィーによって同じ抗血清から精製した。これらの抗血清に類似の組のスクリーニングを行って、上記のように免疫沈降反応を確認した。免疫したヤギ三四匹中一匹がPrP^{Sc}に特異的な抗血清（p165）を産生し（図8）、さらにこの特徴付けを行った。これまでの実験のように、6H4カップリングビーズは、感染マウスの脳からPrP^cとPrP^{Sc}の双方を区別なく沈殿させた（図8、レーン10および11）。PrP 27-30の6H4免疫沈降は、時によくわからない理由で認められるが、この実験では認めなかった（図8、レーン12）。免疫したヤギからの総IgGをビーズにカップリングさせると、正常および感染マウス脳ホモジネートから沈殿するのはたとえあったとしても少量の材料であった（図8、レーン4、5および6）。対照的に、YYR-アフィニティ精製IgG（p165）を磁気ビーズにカップリングさせると、感染したマウス脳からPrP^{Sc}のみが沈殿した（図8、レーン2）。ウサギからのpAbC2ポリクローナル抗体とは異なり、ヤギの抗YYRポリクローナル抗体は、PrP 27-30を沈殿させなかった（図8、レーン3）。これらの抽出物はPK消化を行っても検出可能なPrP 27-30を含み、モノクローナル抗体（下記参照）を評価する同時の実験は同じホモジネートを用いて、PrP 27-30がPK消化後に検出された（図9、レーン3、6、および9）。その上、ウェスタンブロットによる脳ホモジネートの分析により、感染マウスからの脳ホモジネートにおいて検出可能なPrP^{Sc}およびPrP 27-30が明らかとなった（データは示していない）。

【0050】

ヤギポリクローナル抗体産生の他に、同じPrP^{Sc}特異的エピトープに対するモノクローナル抗体も同様に産生されたが、当初のYYRペプチドが1つの連続配列の中に連結されている当初の抗原の誘導体であった。

YYRRYYRY (配列番号: 31)

は、ペプチド配列におけるY/Rエピソードの数を増加させる試みで、そしてチロシンスタッキングの機会および/またはバースタッキングの頻度を増加させる試みで合成した。その上、プリオン蛋白質におけるY/R配列の一つは当該5種においてアルギニンの後に続く(図2)。

YYRRYYRY

ペプチドをKLHに結合させて、マウスを続いて抗原によって免疫した。これらのマウスからの脾細胞を単離してFOマウスB細胞株(ATCC CRL-1646)と融合させて、特異的ハイブリドマクローンを産生した。ELISAにおいて、もう一つの組体8mapと結合したY/Rと反応したクローンから腹水を産生した。これらの腹水からのIgGをプロテインAカラムを用いて精製して、標準的な方法でスクリーニングして確認した。感染マウスからの脳ホモジネートを用いた免疫沈降反応においてPrP^{Sc}を特異的に認識するモノクローナル抗体5個を同定した(1A4、6B1、2B5、2C、および18B)。図9は、これらのモノクローナル抗体の3つ、すなわち1A4、2C、および6B1に関するPrP^{Sc}の特異的沈殿を示す。p165に関して認められたように、p165、1A4、2C、および6B1は、陰性対照抗体、19E(図9、レーン10および11)および非識別抗体6H4(図9、レーン14および15)と比較してPrP^{Sc}を特異的に沈殿した(図9、レーン1、3、および5をそれぞれ、レーン2、4、および6と比較する)。p165とは対照的に、これらのPrP^{Sc}特異的抗体は3つ全てがPrP^{Sc} 27-30を沈殿した(図9、レーン3、6および9)。正常マウス脳ホモジネートを用いた1A4、2C、および6B1沈殿(図9、レーン1、3および5)および19Eによる沈殿において存在するかすかなバンドは、おそらくPrP^{Sc}の非特異的バックグラウンド沈殿と、磁気ビーズから溶出したマウスIgG軽鎖および重鎖との組み合わせを表し、これらはヤギ抗マウスIgG-HRP結合体によってその後検出された(図10)。

【0051】

PrP^{Sc}特異的モノクローナル抗体の連続的な評価から、それらが立体構造依存

的エピトープを通じてPrP^{Sc}の異なるマウス系統を認識することができることが判明した。図11に示すように、1A4は、マウススクレイパーのME7または139A株のいずれかに感染させた異なるマウスから調製した多数の抽出物についての免疫沈降において用いた。これらの実験において、1A4は、株によらず、PrP^{Sc}およびPrP²⁷⁻³⁰を特異的に沈殿させることが判明した。これはまた、他のPrP^{Sc}の特異的モノクローナル抗体についても認められた（データは示していない）。脳ホモジネート（正常、ME7および139A感染）を非還元条件においてSDS-PAGEゲルにおいて電気泳動して、PrP^{Sc}特異的モノクローナル抗体の一つ（1A4もしくは6B1）または6H4によってPrPに関してブロービングすると、6H4のみが変性PrP^{Sc}およびPrP^{Sc}を検出できることは明らかであった。1A4および6B1に関して、PrP^{Sc}特異的決定因子は、試料を変性させると失われており、エピトープの立体構造感受性を確立した。

【0052】

さらに、YYR反応性モノクローナル抗体は、正常およびPrP^{Sc}-/-ノックアウトマウスからの脾細胞または直ちに解離したエキスビが脳細胞の表面上のいかなる細胞表面蛋白質も認識しないことが判明した。生存マウス脾細胞および脳細胞は、脾細胞と脳細胞浮遊液をフィコール勾配によって遠心することによって単離した。図13に示すように、脾細胞を記載のFITC結合抗体（実線）またはアイソタイプマッチFITC標識対照抗体（破線）によって染色した。非生存細胞は、ヨウ化プロピジウムによる分析から除外した。脾細胞（図13）または脳細胞（示していない）上での表面免疫反応性がないことは、上記の構造検索によって示唆されるように、YYR立体構造エピトープがまれであることを示している。その上、認識されるシグナルがないことは、脾細胞と他の試験細胞の細胞表面でのPrP^{Sc}免疫反応性の試験に関して許容されるバックグラウンドを提供する。細胞表面PrP^{Sc}の検出は、ヒトおよび動物プリオン疾患感染症に関する診断試験として有用である。最後に、細胞表面免疫反応性がないことは、脾細胞と脳細胞が6H4免疫組織化学によって検出可能なPrP^{Sc}を有する（示していない）ことから、抗YYR抗体がPrP^{Sc}を認識しないという事実の独立した確認を提供する。

【0053】

YVRエпитープの種特異性もまた調べた。スクレイピー感染ハムスターからの脳ホモジネートを用いる試験において、上記のPrP^{Sc}特異的モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、ハムスターPrP^{Sc}を免疫沈降することが判明した(図14)。さらに、感染マウス組織による試験において明らかになったPrP^{Sc}およびPrP 27-30に関する類似の特異性も認められた。例えば、モノクローナル抗体1A4は、PrP^{Sc}およびPrP 27-30を特異的に免疫沈降するが(図14、レーン3および4)、ポリクローナルヤギ抗体p165は、感染したハムスター脳(図14、レーン7、8、9および10)からのPrP^{Sc}のみを特異的に免疫沈降する。ハムスターの他に、感染したヒツジ、ウシ、およびヒト組織からのPrP^{Sc}は、望ましければ、本明細書に記載のいかなる技術も用いて特異的に沈降する可能性がある。

【0054】

材料および方法

上記のこれらのPrP^{Sc}特異的抗体は、以下の材料および方法を用いて得て試験した。

【0055】

円偏光二色性

円偏光二色性は、ホルネマン&グロックシュバー (Hornemann and Glockshuber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6010, 1998) によって記載された方法に従って実施した。遠紫外線円偏光二色性スペクトルは、アビビ円偏光二色性分光計モデル62DS (レークウッド、ニュージャージー州) 上で光路0.1 cmの石英のセルを用いて25℃で記録した。1.0 nmステップで、1.0 nmバンド幅、および採取時間4秒/ステップで、195 nmから260 nmまでのスペクトルを得た。実験データは、平均残基楕円性として表記した ($\text{deg } \theta \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)。

【0056】

蛍光分光光度計

蛍光分光法は、チンら (Chin, Biochemistry 31: 1945~51, 1992) に記載された方法に従って実施した。

【0057】

YVRペプチドを免疫するための調製物

PrP^{Sc}に対する抗体を作製するために、アミノ酸配列

Acetyl -Cys-Tyr-Tyr-Arg-NH₂ (YYR) (配列番号 : 32)

を有するペプチドを合成して、KLHと結合させて、周知の技術を用いてウサギに筋肉内注射した。

【0058】

ペプチドのアミノ末端において、ペプチドを蛋白質担体と結合させるために、システイン残基を付加した。ペプチドのアミノ基はアセチル化によってブロックして、ペプチドのカルボキシル基はアミド化によってブロックした。

【0059】

ペプチド合成

ペプチドは、手動または自動 (MPS396ペプチドシンセサイザー、アドバンスドケムテック社) の固相ペプチド合成法を用いて合成した。アミノ酸残基のカップリングは、Fmocペプチド合成化学を用いて行った (フィールズ (Fields) ら、1990、IJPPR 35、161)。合成は、ワングまたはアミドリンク樹脂上で、アミノ酸の側鎖を完全に保護して行った。アミノ酸の α -NH₂ 基はFmoc基によって保護されたため、三官能基アミノ酸の側鎖に関して以下の保護基を選択した：

システイン：5-トリフェニルメチル (Trt)

アルギニン：2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル (Pbf)

チロシン：tert-ブチルエーテル (tBu)

【0060】

BOP、PyBOP、またはTBTUは、カップリング反応の化学および難しさに応じて活性化剤として用いた。化学物質は全て、アドバンスドケムテック社、バケム社、およびカルビオケム／ノババイオケム社から購入した。配列の残基間の各ペプチド結合の形成は、カップリング試薬3～6倍過剰量を用いて、そしていわゆる二重カップリングを用いて確実にした；このことは、成長しつつあるペプチド鎖に付加される各アミノ酸に関して、カップリング反応を繰り返すことを意味する。

【0061】

樹脂からのフルオペプチドの切断

合成後、ペプチドを切断混合物として試薬Kを用いて樹脂から切断した：水（2.5%）、TIS（2.5%）、EDT（2.5%）、TFA（92.5%）。次に、ペプチドを冷ジエチルエーテルによって沈殿させた。沈殿物を遠心して、ジエチルエーテルで3回洗浄し、20～50%AcCN/水混合液に溶解して、凍結乾燥した。粗産物の分析は、分析的RP-HPLCおよびエレクトロスプレーMSを用いて実施した。

【0062】

HPLC精製

粗ペプチドは、バイダックC18カラム2.5×25 cm上で、0.06%TFA（勾配1%/分、流速10 ml/分）を加えた10～50%アセトニトリル水溶液の直線勾配を用いて、UVを215 nmと254 nmでモニターするRP-HPLC（逆相高速液体クロマトグラフィー）によって精製した。分析的HPLCを用いて、分画の純度を推定した。最終産物は凍結乾燥ペプチドとして得て、これは分析的HPLC（バイダックC18、0.46×25 cm、10～60%アセトニトリル水溶液の直線勾配、0.1%TFA、1%/分、流速1 ml/分、215 nmおよび254 nmでのUV吸収によって検出）によって、純度が少なくとも95%であると推定された。純粋なペプチドは、標準的な技法に従って、SCIEX API III質量分析計を用いて分子量分析によって同定した。

【0063】

分析データ

ペプチドのRP-HPLC上での滞留時間は、21.215分であった。ペプチドの理論的分子量は、644.74であると計算された；分子量分析による実際の分子量は646.5であることが判明した（MW+H⁺）。

【0064】

ペプチドと担体とのカップリング

ペプチドを担体、この場合、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）とカップリングさせた。そのようなカップリングにとって有用な他の担体には、アルブミン、卵白アルブミン、8map、またはライソザイムが含まれるがこれらに限定されることはない。カップリングは、システインのメルカプト基とのチオエーテ

ル結合によって行う。このタイプの結合は、ペプチドが担体蛋白質と明確にカップリングされるという長所を有する。

【0065】

KLHとのカップリングは以下のように実施した。ペプチド10 mgを磷酸緩衝液 (PBS 1×) 2 mlに溶解した。KLH (ピアス社、製品番号77100) 1 mlをペプチド溶液に加えて、攪拌した (ペプチド1モル/アミノ酸50個)。KLH濃度は10 mg/mlであった。グルタルアルデヒド (25%水溶液) 20 μ lを絶えず攪拌しながらペプチド/担体溶液に加え、1時間インキュベートして、その後グリシン停止溶液を加えた。PBSに対する透析によってペプチド/担体結合物をペプチドから分離した。

【0066】

さらなるYYRペプチド (例えば、

CYYYRYYRYY (配列番号 : 33)

および

CKYEDRYRYY (配列番号 : 34)

は、標準的な方法、例えば、本明細書に記載の方法に従って合成した。他の合成ペプチドは、上記の合成方法を適当に変更することによって調製することができる。そのようなペプチドはまた、当技術分野で既知の標準的な方法を用いて特徴を調べる (例えば本明細書に記載の方法)。

【0067】

ウサギの免疫

標準的な方法を用いてポリクローナル抗体を調製し、3～8週間間隔の反復追加注射によって免疫応答を増強した。免疫の成功は、ウェスタンブロットまたはELISAまたはその両者において抗体濃度を決定することによって確認した。より詳しく述べると、PrP^{Sc}に対するポリクローナル抗体を産生するために、KLHに結合したトリペプチドYYRを164日免疫レジメに従ってウサギに注射して、その後特異的抗体を産生した動物から採血した。

【0068】

免疫前血清を採取するために、ウサギ一羽あたり血液10 mlを免疫前対照として採取した。フロイントの完全アジュバントによって予備的な免疫を行い、その後フロイントの不完全アジュバント (IFA) (1 ml/ウサギ、0.5 ml/大腿) によって追加免疫を行った。各注射は、精製ペプチド約200 μ gで構成された。21、42、および70日目、IFAと共に追加免疫注射を行った。31、42、および80日目、滴定のために中心耳動脈から血液10 mlを採取した (6 ml/kg/ウサギ)。80日目、血清の力価をチェックして、さらに4週間間隔で注射を3回 (IFA)、その10日後に採血した。最後の追加免疫の10日後、麻酔したウサギを心穿刺によって放血して、抗血清を採取した。

【0069】

ヤギの免疫

ヤギポリクローナル抗体を標準的な方法に従って作製した。ヤギ3匹を以下のように免疫した。1日目、全てのヤギにYR-KLH結合体1 mgをフロイントの完全アジュバントと共に一次免疫を行った。追加免疫は、YR-KLH1 mgをフロイントの不完全アジュバントと共にヤギ3匹中2匹に注射し、第三のヤギにはYR-8map結合体1 mgをフロイントの不完全アジュバント共に注射することによって行った。三匹の血液それぞれからの血清試料をYR-BSA結合体に対する反応性をELISAによって調べた。第三の組の血液から、総IgGを硫酸アンモニウム沈殿によって精製して、YR-反応性IgGをYRアフィニティカラムを用いて精製した。IgG分画を、本明細書に記載のようにPrP^{Sc}に対する反応性に関して調べた。正確な免疫スケジュールは以下の通りであった：1日目、一次免疫；21日目、初回追加免疫；30日目、初回採血；46日目、二回目の追加免疫；53日目、二回目の追加免疫；60日目、二回目の採血；76日目、三回目の追加免疫；83日目、三回目の追加免疫；および90日目、三回目の採血。

【0070】

または、本明細書に記載の合成ペプチドおよび標準的なハイブリドーマ技術を用いてモノクローナル抗体を調製してもよい (例えば、コーラー (Kohler) ら、Nature 256、1975；コーラー (Kohler) ら、Eur. J. Immunol. 6:511、1976；コーラー (Kohler) ら、Eur. J. Immunol. 6:292、1976；ハンメルリンク (Ham

merling) ら、「モノクローナル抗体とT細胞ハイブリドーマ (Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas)」、エルスピア、ニューヨーク州、1981年；アウスユベール (Ausubel) ら、1999年「分子生物学の現行プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」、ウィリー・インターサイエンス、ニューヨークを参照のこと。産生されると、モノクローナル抗体も同様に、免疫沈降およびウェスタンブロット分析によって（例えば、上記のアウスユベール (Ausubel) らに記載の方法を用いて）、特異的PrP認識に関して調べる。

【0071】

マウスの免疫

モノクローナル抗体の産生は以下のように実施した。マウスを、マウスPrP-AP融合蛋白質を含むバキュロウイルス上清によってフロイントの完全アジュバントと共に免疫して、二週間後に同じ抗原をフロイントの不完全アジュバントと共に追加免疫した。免疫2週間後、マウスをPrP-AP上清+

KLH-CYYRRYYRY

結合体100 μ gおよび

KLH-CKYEDRYRE

結合体100 μ gの混合物によって追加免疫した。これらのマウスからの脾細胞をF0マウスB細胞株 (ATCC CRL-1646) と融合させて、特異的ハイブリドーマクローンを作製した。ハイブリドーマ上清をELISAによってスクリーニングした。PrP-A Pまたは

CKYEDRYRE

配列に対して反応する上清はなかったが、YPR-8map結合体に反応するクローンが存在した。

【0072】

抗体の精製

総ウサギIgGは、ファルマシア社のプロテインAハイトラップカラムを用いて、製造元の推奨に従って血清から精製した。簡単に説明すると、ハイトラップカラムを開始緩衝液 (0.2 M 磷酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0) のカラム3倍容量によ

って平衡にした。ルアーアダプターを通してシリンジを用いて血清をカラムに適
用した。次に、カラムを開始緩衝液5mlによって洗浄した。結合した蛋白質を0.
1 Mグリシン、pH 3.0によって溶出し、1 Mトリス、pH 8.0を含む (50 μ l/試料5
00 μ l) エッペンドルフチューブに採取した。分画をSDS-PAGE上で分析した。

【0073】

ヤギポリクローナル抗体は、上記のように血清試料から精製した。

【0074】

マウスモノクローナル抗体は腹水として産生され、プロテインAカラムキット
(ピアス社)を用いて製造元の指示に従って精製した。簡単に説明すると、腹水
試料を最終比1:1で結合緩衝液によって希釈した。次に試料を、予め結合緩衝
液によって平衡にしたカラムの上部に加えて、マトリクスの中を通過させた。通
過した材料を採取して、結合緩衝液5倍容量によってカラムを洗浄した。マイル
ドな溶出緩衝液をカラムに加えて、マトリクスから結合IgG抗体を放出した。IgG
溶出緩衝液に切り替えることによって、他の抗体アイソタイプを回収した。抗体
は全て1ml分画において回収し、これをBCAによって分析して総蛋白質含有量を
決定し、SDS-PAGE電気泳動によって分析して抗体の純度を決定した。最も高いIg
G収量を含む分画を、これをD塩カラム (ピアス社)に通過させることによって脱
塩した。抗体分画を割付して、PBS中で -80°C で保存した。

【0075】

次に、上記の技法を用いて産生された抗体を以下のように、高親和性結合に関
して調べた。

【0076】

ウシ脳ホモジネートの調製

ウシ脳ホモジネートを調製するために二つの方法を用いた。一つの方法におい
て (A)、脳の試料を、組織ホモジナイゼーション緩衝液 (10%蔗糖、20 mM HEP
ES pH 7.5、2%サルコシル、および5 mM EDTA) 中でポリトロン (OMNI GLH) を
用いてホモジナイズした。ホモジネートは、最終濃度1% (w/v) で用いた。

【0077】

第二の方法 (B) において、脳ホモジネートは10% (w/v) 溶液として調製した

。ウシ脳をダウンスホモジナイザー（テフロン（登録商標）の乳棒）において、冷溶解緩衝液（100 mM NaCl、10 mM EDTA、0.5%ノニデットP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウムのトリスHCl溶液、pH 7.4）2容量中で破砕した。試料を氷中で20分インキュベートしてから、ホモジナイザーにおいてさらに15回粉砕した。細胞破片を4℃、3000 rpmで15分間の遠心によって除去した。次に、上清の蛋白質含有量を定量した。

【0078】

ハムスターおよびマウスホモジネートの調製

ハムスターまたはマウス脳組織を十分なホモジナイゼーション緩衝液（PBS、0.5%NP-40、0.5%デオキシコール酸塩）に加えて10%（重量/容積）ホモジネートを得た。組織を18ゲージ針および22ゲージ針の中を繰り返し通過させることによってホモジナイズした。細胞の破片を500gで20分を2回連続して遠心することによって除去した。上清中の総蛋白質は、BCAキット（ピアス社）によって定量し、ホモジナイゼーション緩衝液を用いて濃度を最終濃度5mg/mlに調節した。各200 μ lを含むアリコートを調製して-80℃で保存した。

【0079】

磁気ビーズ結合体

精製抗体またはBSA 60~150 μ gを、製造元によって提供されたプロトコールに従って、トシル活性化磁気ビーズ（ダイナル社） 6×10^8 個に結合させた。簡単に説明すると、抗体あたり均一な非結合ビーズ浮遊液1mlを2回洗浄して、抗体またはBSAを含むPBS pH 7.4に再浮遊させた。混合物をローター上で37℃で20~24時間インキュベートした。次に、混合物を回旋させながらPBS 0.1%BSA中で5分間2回洗浄し、ブロッキング緩衝液（0.2 MトリスpH 8.5、0.1%BSA）中で回旋させながら37℃で4時間インキュベートした。PBS 0.1%BSAによってさらに5分間洗浄した後、抗体結合ビーズ結合体をPBS 0.1%BSA 1%ツイーン-20中で10分間洗浄して、PBS 0.1%BSAによって再度洗浄し、4℃で保存した。

【0080】

プロテナーゼK消化

ウシ脳ホモジネートをプロテナーゼK溶液（100 μ g/ml）と共に50℃で30分間

インキュベートした。消化は、プロテアーゼ阻害剤PMSF (2 mM) によって停止させた。

【0081】

マウスおよびハムスター脳ホモジネートを最終濃度45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテナーゼKと共に37°Cで30分消化した。反応は19 mM PMSF最終濃度を加えることによって停止させた。

【0082】

免疫沈降

脳抽出物10 μl を免疫沈降緩衝液 (PBS 3 %NP-40、3 %ツイーン20) 950 μl に加え、37°Cで30~60分インキュベートした。PrP 27-30のビーズ結合体との反応性を評価する実験の場合、1 mg/mlプロテナーゼK50 μl を加えることによって、インキュベーションを開始した。プロテナーゼKによって処理しない試料はなお、適当な時間37°Cでインキュベートした。インキュベートした後、100 mM PMSF溶液60 μl を双方の組の試験管に加えた。次に、再浮遊させたビーズ結合物100 μl を混合物に加えて、室温で2時間回旋させながらインキュベートした。ビーズを洗浄緩衝液 (PBS 2 %NP-40 2 %ツイーン-20) によって3回洗浄して、各洗浄後攪拌して再浮遊させた。最後に洗浄した後、ビーズを2×ローディング緩衝液 (100 mMトリスpH 6.8、4 %SDS、0.015%プロモフェノールブルー、20%グリセロール) 20 μl に再浮遊させ、95°Cで3分間加熱した。

【0083】

ウェスタンブロット

脳ホモジネートのPrP^{Sc}含有量は、標準的な方法に従ってウェスタンブロットイングによって決定した。蛋白質試料を2×試料緩衝液と1:1の比で混合し、100°Cで5分間沸騰させた。SDS-PAGE分析は標準的な方法に従って実施した。試料を、予め染色した分子量マーカー (バイオラド社) と共に予め形成された15%アクリルアミドゲル (バイオラド社) に適用した。プロモフェノールブルー色素の先端がゲルの底に達するまで、ゲルを100 Vで泳動させた。分離した蛋白質をPVDfメンブレンに100 Vで1時間転写した。メンブレンをブロッキング緩衝液において30分ブロックし、その後これをTBSTによって3回洗浄した。次に、メンブレ

ンを変性PrPに特異的な抗体と共に室温で2時間インキュベートした。メンブレンを上記のように洗浄してから、ヤギ抗マウスIgGアルカリホスファターゼ結合二次抗体 (TRSTによって5000倍希釈) と共にインキュベートした。洗浄後、化学発光基質CDPスターによって発光させて、シグナルをX線フィルムに露出した。

【0084】

フローサイトメトリー

組織をワイヤーメッシュに通過させることによって、Balb/cマウスから脾細胞浮遊液を調製した。細胞を Ca^{2+} または Mg^{2+} を含まない冷ダルフッコPBSによって一度洗浄して、リンフォライト (チェダーレーン) を細胞浮遊液の下に敷いて、1300 gで20分間遠心することによって生存細胞を単離した。細胞を、 Ca^{2+} または Mg^{2+} 、2.5%ウシ胎児血清を含まない冷ダルフッコPBSによって1回洗浄し、丸底96ウェルプレートにおいてウェルあたり細胞 0.5×10^6 個を加えた。細胞を遠心して、抗体-FITC結合体50 μl に Ca^{2+} または Mg^{2+} 、2.5%ウシ胎児血清を含まないダルフッコPBS中で最終濃度1/10で再浮遊させて、氷中で15分間置いた。細胞を、 Ca^{2+} または Mg^{2+} 、2.5%ウシ胎児血清を含まないダルフッコPBSによって2回洗浄して、ヨウ化プロピジウム1 $\mu\text{g/ml}$ を含む同じ培地に再浮遊させた。細胞をコールターエピックスフローサイトメーターによって分析して、大きさと粒度 (前方および側方散乱) および生存率 (ヨウ化プロピジウム蛍光の排除) によるゲートで制御した。

【0085】

FITC抗体結合

蛍光標識mAbは、フルオログキット (シグマ社) を用いて、製造元の指示に従って作製した。簡単に説明すると、各抗体0.5 mgを濃重炭酸緩衝液によってpH 9に上昇させ、FITC保存溶液を加えてFITC:抗体比20:1を得た。次に、パイアルを室温で2時間インキュベートした。混合物をセファデックスG-25Mカラムに通過させることによって、標識抗体を遊離のFITCから分離した。LJLバイオシステムズアナリストを用いて535 nmでのFITC放出を測定することによって、結合抗体の蛍光標識の成否を調べ、ELISAによって抗体がYYR-8map結合体に対するその結合活性を保持しているか否かを調べた。

【0086】

脳ホモジネートのPrP含有量の測定

脳試料から調製した抽出物中のPrP^CおよびPrP^{Sc}の存在は、mAb 6H4 (図3)を用いるウェスタンブロッティングによって確認した。PrP^C (33~35 kDa)の分散したバンドパターンは、正常およびBSE感染脳試料の双方から調製した抽出物において認められた。抽出物をプロテナーゼKによって処理した後、PrP^Cは完全に消化されたが、PrP^{Sc}は、27~30 kDaのバンドとして出現した。

【0087】

全ての脳は、PrP^{Sc}の存在を特徴とし、これはプールの抽出物における総PrP含有量の15~20%を占めた (図15)。

【0088】

可溶性プロトカドヘリン-2 (sPC2) 発現

PrP結合蛋白質であるPC2を、PrP^CおよびPrP^{Sc}に対する捕獲試薬として用いて、pAbC2のPrP^{Sc}特異性を証明した。カドヘリンドメイン6個全てをコードするが、膜貫通ドメインの開始部位で切断されているヒトプロトカドヘリン-2配列を含むプラスミド (HU-PC43 3' trunc/PC1nel) をCOS細胞にトランスフェクトさせた。プロトカドヘリン-2の可溶性型を含む培養培地を回収して、抗PC2モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによってsPC2の存在を決定した。「プリオン蛋白質結合蛋白質とその利用 (Prion Protein Binding Proteins and Uses Thereof)」と題する国際公開公報第97/45746号は、プリオン蛋白質に対する受容体としてのPC2の使用を記載しており、参照として本明細書に組み入れられる。

【0089】

ELISAにおけるpAbC2の試験

pAbC2が、組換え型PrP (rbPrP) を用いてPrP^Cと比較した場合にウシ脳抽出物からのPrP^{Sc}を特異的に認識するか否かを決定するために、ELISAアプローチを用いた。PrP^{Sc}含有脳抽出物またはrbPrPのいずれかのプールを用いて、PrP^{Sc}に対するpAbC2の特異性を試験した。

【0090】

イムノロンELISAプレート (ダイネックス社) のウェルを4℃で、PC2含有培養

上清の、50 mM トリス、pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM CaCl_2 を含むTBS緩衝液溶液によって一晚コーティングした。BSE脳抽出物実験に関して、対照ウェルはMek-4を含む上清によってコーティングした；rbPrP実験に関して、ウェルに対する抗体の非特異的結合を調べるための対照として牛乳を用いた。ELISAプレートの可溶性PC2によるコーティングは、抗PC2モノクローナル抗体によって確認した。SLT「コロンプス」マイクロプレートウォッシャー（デカン社）を用いて0.05% Tween20を含むTBSによってウェルを4回洗浄し、ウェルに0.2% I-ブロック（トロピクス社）のTBST溶液を満たし、37°Cで1時間インキュベートした。プレートを洗浄して、ウシ脳ホモジネート（1% w/v TBS溶液に希釈）またはrbPrPを指定されたウェルに加えて、室温で1時間インキュベートした。ウェルをTBSTによって4回洗浄した。pAbC2を適当なウェルに加えて、室温で1時間インキュベートした後、抗ウサギまたはマウスIgG/西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体（5000倍希釈）の1%脱脂乳を含むTBST溶液100 μl と共にさらに45分間インキュベートした。ウェルをTBSTによって4回洗浄した。ペルオキシダーゼに関する基質としてTMB/ H_2O_2 によってシグナルを検出した。2 M 磷酸100 μl を加えることによって反応を15分後に停止させた。SLTマイクロプレートリーダーを用いて620 nmを参照として450 nmでシグナルをモニターした。PC2に対するPrP結合を、陰性対照Mek-4または牛乳に対するPrP結合と比較することによって、特異的陽性シグナルを決定した。免疫前対照は結合を示さなかった。

【0091】

BSE感染ウシ脳抽出物の全ての場合について、これらの点に関して記録された絶対値は、プレート上でのsPC2の有無にかかわらず、正常な脳からの抽出物に関する記録より高かった。BSE試料における凝集によって、ELISAプレートのウェルに対する非特異的接着が起こり、したがってより高いシグナルが記録されと考えられる。しかし、それにもかかわらずBSE試料の値は、Mek-4対照によってブロッキングした同じ試料において得られた値より大きかった。

【0092】

pAbC2は、Mek-4結合材料よりPC2-結合材料に対して強く反応し、しばしばMek-4対照に対する結合より1.5～2倍高く、PrP^{Sc}に対する特異的結合を示唆してい

る(図16)。二次検出試薬としてのpAbC2抗体は、ほとんどの場合、PrP^{Sc}陽性試料のみに結合し、このことは、試薬のこの組み合わせによって、プロテアーゼ前処理を行わなくともPrP^{Sc}検出が可能となる可能性があることを示唆している。

【0093】

免疫沈降を用いたPrP検出アッセイ法

pAbC2がELISAアッセイ法においてPrP^{Sc}を認識することを確認した後、pAbC2がウシ脳抽出物からPrPを免疫沈降できるか否かを確認するために、次に、免疫沈降を行った。特に明記していない限り、いくつかの正常またはBSE-感染脳抽出物のプールを実験に用いた。脳の試料は全て、これまでPrP^{Sc}の存在を特徴としていた。簡単に説明すると、10%脳ホモジネート20 μ lを、mAb6H4と共にpAbC2の0.5 M GuHClを含むTBS溶液のような、PrPに結合することが知られている様々な抗体と共に室温で2時間インキュベートした。磁気プロテインAまたはプロテインGカップリングビーズ(ダイナビーズ)25 μ lと共に室温で1時間インキュベートした後、アガロースビーズを磁石を用いてペレットにした。ペレットを3回洗浄した後、ウェスタンブロット上で分析のためにSDS-試料緩衝液中で煮沸させた。PrPは、抗PrPポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって検出された。

【0094】

pAbC2を用いて、PrPは正常な脳からの抽出物を含む反応では検出されなかったが、BSE感染試料からの抽出物を含む反応では、PrPと類似の位置で移動するバンドを認めた(図7)。これらの結果は、pAbC2がPrP^{Sc}に対して特異的であるが、PrP^Cに対して特異的でないことを示すELISA試験をさらに実証する。カップリングしていないビーズを陰性対照として用い、これはPrP^{Sc}の沈降を示さなかった。mAb6H4は免疫沈降反応における陽性対照として用いた。予想されるように、PrP^{Sc}は、mAb 6H4を用いて正常脳から効率よく沈殿した。

【0095】

用途

本明細書において記載したPrPペプチドとPrP^{Sc}特異的抗体は、例えば、以下の診断、治療、ワクチン、および汚染除去目的のためと共に、プリオン疾患を診断

または治療するために、またはプリオン試料の汚染を除去するために用いることができる新規化合物のスクリーニングに用いてもよい。

【0096】

プリオン疾患の診断のための試験キット

エピトープ特異的抗PrP抗体は、プリオン疾患の検出またはモニタリングにおいて一般的に診断に用いられる。例えば、抗PrP抗体は、標準的な検出アッセイ法を用いて、生体試料（例えば、組織生検、細胞、または体液）においてPrP^{Sc}の有無をモニターするために用いてもよい。免疫学的アッセイ法は、PrP^{Sc}の直接検出を含んでもよく、PrP^{Sc}の存在に関して大量の試料をスクリーニングするために特に適している。例えば、YYR（上記）のような連続的なYYXエピトープに対して産生されたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を、複合体形成を測定するために、いかなる標準的なイムノアッセイフォーマット（ELISA、ウェスタンブロット、免疫沈降、フローサイトメトリー、またはRIAアッセイ法）において用いてもよい。さらに、望ましければ、本明細書に記載した抗体のPrP^{Sc}に対する特異性のために、免疫学的分析の前の、試験試料のプロテアーゼによる前処置を省略してもよい。放射活性、蛍光、色素発生（例えば、アルカリホスファターゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ）、化学発光標識、または標識したハプテン特異的抗体もしくは他の結合パートナー（例えば、アビジン）を用いて可視化してもよいハプテン（例えば、ジゴキシゲニンもしくはビオチン）を含むがこれらに限定されることはない、直接または間接的に可視化してもよいいかなる適当な標識もこれらの検出アッセイ法において用いてもよい。例としてのイムノアッセイ法は、例えばアウスベールら（Ausubel、上記）、ハーロウ&レーン（Harlow and Lane、「抗体：実験アプローチ（Antibodies：A Laboratory Approach）」コールドスプリングハーバー研究所、ニューヨーク（1988））、およびモイナー&シンメル（Moynagh and Schimmel、Nature 400：105、1999）に記載されている。例えば、本明細書に記載の抗体を用いて、PrP^{Sc}は、本明細書に記載のような標準的なフローサイトメトリー方法を用いて細胞表面（例えば、白血球）において容易に検出される。適当な対照試料と比較して標識した化合物レベルの増加を含むことが判明した試料を、PrP^{Sc}の存在を示すものと見なし

、このように、プリオン関連疾患であることを示す。

【0097】

さらに、プリオン疾患を診断するために有用な新規化合物は、本発明の抗体を用いて同定してもよい。例えば、コンビナトリアル化学ライブラリーまたは低分子ライブラリーをスクリーニングして、標準的な方法（例えば、平衡透析、ピアコア分析、または拮抗阻害）に従ってYYXエпитープに対する一つまたはそれ以上の抗YYX抗体の結合相互作用の阻害能を有する化合物を同定する。そのようなライブラリーは、天然物、合成（もしくは半合成）抽出物、または当技術分野で既知の方法による化学物質ライブラリーに由来してもよい。医薬品の研究開発分野の当業者は、化合物の正確な起源が本発明のスクリーニング方法にとって重要でないことを理解するであろう。天然化合物起源の例には、植物、真菌、原核細胞、または動物起源と共に既存の化合物の改変が含まれるがこれらに限定されることはない。糖質、脂質、ペプチド、および核酸骨格の化合物を含むがこれらに限定されることはない。かかる数の化学化合物のランダムまたは定方向合成（例えば、半合成、または全合成）も得るために、多数の方法がまた利用可能である。合成化合物ライブラリーは、購入して得てもよく、または当技術分野で既知の方法に従って産生してもよい。さらに、望ましければ、いかなるライブラリーまたは化合物も、標準的な化学、物理、または生化学的方法を用いて容易に改変される。

【0098】

抗YYX抗体のYYXエпитープに対する結合を最低濃度で阻害する化合物は、「高親和性競合物質」とは呼ばれ、本発明の診断方法において有用である。次に、抗YYX抗体の活性を模倣する（例えば、抗YYX抗体の相補性決定領域（「CDR」））そのような高親和性競合物質を、Pr^{Sc}の効率的な認識および結合に関して調べる。同定されれば、プリオン感染症に対する実質的にいかなる診断試験の捕獲相においても用いるために、高親和性競合物質を固体基質（例えば、ELISAウェルまたはビーズ）にカップリングさせてもよい。

【0099】

抗Pr^{Sc}モノクローナル抗体のIgMへの変換

診断方法はまた、IgM抗体を用いて行ってもよく、これはPrP^{sc}に対する結合力が増加している。PrP^{sc}に対する抗体の結合力を増加させるために、特異的結合IgG Fab領域遺伝子を、以下のように5価IgM断片の中に構築してもよい。

【0100】

免疫グロブリン(Ig)分子は、明確な構造および機能的ドメインで構成される。各免疫グロブリンは、重鎖(それぞれ50~80 kD)2個と軽鎖(それぞれ25 kD)2個で構成される。重鎖は、4つのタイプの免疫グロブリン遺伝子、すなわちV_H、D_H、J_H、およびC_Hのうちの1つの再配列産物である。最初の3つの遺伝子は、集合的に可変領域として知られ、これらが組合わさって、重鎖の結合部位を形成する。第四の遺伝子、C_Hは、定常領域とも呼ばれ、結合部位の形成には関与していないが、免疫系の他の成分による重鎖の認識に関与している。同様に、軽鎖は、三つのタイプの免疫グロブリン遺伝子、V_L、J_L、およびC_Lの一つのコピーの再配列に由来する。重鎖の場合と同様に、軽鎖の結合部位は、V_LおよびJ_L遺伝子の組み合わせによって形成されるが、C_L遺伝子は関与していない。このように、いかなる所定の抗体の結合部位も、2つの可変領域の相互作用によって形成される：V_H-D_H-J_HポリペプチドとV_L-J_L-ポリペプチド。ほとんどの抗体は、そのような結合部位を2個有する。

【0101】

免疫応答のあいだ、形成される第一のタイプの免疫グロブリンはIgMと呼ばれる。一般的に、IgMは、比較的低親和性の結合部位を含むが、抗体分子あたり結合部位5個を発現することによってその特徴を代償している。免疫応答が進行すると、IgGのような他の抗体が産生され、これらは、先に存在するIgMよりかなり高い親和性を含むが、1分子あたりの結合部位は2個に過ぎない。

【0102】

上記のように、トリペプチドYYRまたは関連モチーフは、PrP配列において3回出現するように思われる。ウシ、齧歯類およびヒトPrPにおいて、モチーフはYYRとして2回、そしてYYXとして1回現れる。従って、これらの個々のモチーフのより多くが特定の試薬によって検出されれば、試薬の感度はより高くなるであろう。最高の親和性結合部位はIgG分子内に含まれる。しかし、それらが含む結合

部位は2個に過ぎないため、これらの抗体は、PrP^{Sc}の検出にとって最適な試薬ではないかもしれない。IgM分子は、十分な結合部位を含むが、それらは親和性が低く、したがって、それらはPrP^{Sc}を検出するために最適な試薬ではない。したがって、Ig分子のモジュール構築は、この問題に対する解決を提供し、PrP^{Sc}を検出するために最適なIgを構築する方法を提供する。

【0103】

抗PrP^{Sc}ポリクローナル抗体を産生するために用いられるYYR-KLH抗原を用いてマウスを免疫する。この分野において確立され、高親和性IgG抗体が得られることがわかっているプロトコルを用いて、マウスを免疫する。B細胞ハイブリドーマを標準的な方法によって作製し、これらの細胞から生成され、分泌されたモノクローナル抗体を含む組織培養上清を、ELISAによって抗原のYYR部分に対する免疫反応性に関して調べる。抗体を産生する再配列した免疫グロブリン遺伝子を、ハインリクス (Heinrichsら、J. Immunol. Methods, 178: 241~51, 1995) に記載された片面PCRプロトコルを用いてクローニングする。重鎖と軽鎖の可変領域のみをクローニングする必要がある。次に、これらを標準的な方法を用いて、適当な定常領域、この場合IgM定常領域の分泌型であるが、他のIgアイソタイプとなりうる領域を含む発現ベクタープラスミドに挿入する。この領域は、マウスまたはヒト起源のいずれかから得てもよく、後者はヒトに対する投与後の副作用を最小限にするために抗体をヒト化するために得てもよい (ウィンター&ハリス (Winter and Harris)、Immunol. Today, 14(6): 243~6, 1993; ボーガン (Vaughan) ら、Nature Biotech. 16(6): 535~9, 1998の論評を参照)。次に、例えばIgM分子に由来する定常領域にカップリングさせたIgG分子に由来する可変領域を含むベクターを用いて、細菌、または真核細胞発現系のいずれかにおける組換え型抗PrP^{Sc}抗体の産生を促進する。そのような戦略の例に関しては、ポウル (Poul、Immunotechnology 1: 189~96, 1995) を参照のこと。

【0104】

または、YYR-KLH抗原のYYR部分に対して最善の反応性を示す可変領域の組み合わせは、単離および上記の完全長の抗体へのサブクローニングを行う前に、文献に記載されているように (マークス (Marks) ら、J. Mol. Biol. 222: 581~597

、1991；ボーガン (Vaughan) ら、Nature Biotech. 14 : 309~14、1996)、フー
ージディスプレイライブラリーから選択されるであろう。

【0105】

抗PrP^{Sc}モノクローナル抗体のIgEへの変換

試料 (例えば、血液試料) においてPrP^{Sc}を検出するもう一つの方法は、PrP^{Sc}
モノクローナル抗体をIgEへ変換することを含む。PrP^{Sc}は、様々な大きさの凝集
体を形成するが、通常これはPrP^Cでは形成されない。これらのPrP^{Sc}多量体は、
感染者の血液中に存在する可能性がある。この特徴を用いてバイオアッセイ法に
よってPrP^{Sc}を検出してもよい。特に、PrP^{Sc}に対して特異的であるか、またはPr
P^CとPrP^{Sc}とに交叉反応するモノクローナル抗体を、IgEアイソタイプにサブク
ローニングすることによって変換する。これは、IgM定常領域の代わりにIgE定常領
域を用いて、上記と同じ方法を含む。

【0106】

IgE抗体は、IgE定常領域に対して特異的な細胞表面受容体によって結合してい
る。これらの受容体は、体内に広く分布して、アレルギー反応において重要な役
割を有する。本発明において検討している受容体、IgEに対する高親和性受容体
(Fc RI) は、肥満細胞、好塩基球、好酸球、単球、およびランゲルハンス細胞
において認められる。これはポリペプチド鎖3個からなる細胞表面受容体であり
、IgEに対して強い親和性を示す ($K_a=10^{-10}$ M)。各Fc RIは、IgE1分子に結合
する (クルクジツキ&メツガー (Kulczycki and Metzger)、J. Exp. Med. 140
: 1676、1974；バルクレイ (Barclay) ら、「白血球抗原ファクトブック (The L
eukocyte Antigen Factsbook)」、サンジエゴ、アカデミックプレス、1997)。
しかし、シグナル伝達反応を開始させるためには、多数のFc RI受容体を多価抗
原によってクロスリンクさせる (メツガー (Metzger) ら、J. Immunol. 149 : 14
77、1992)。細胞内シグナル強度は、クロスリンクの程度と比例する。これが起
こると、Fc RIを発現する細胞は脱顆粒を起こして、ヒスタミンおよび他の貯蔵
されたメディエータを急速に放出する。

【0107】

本発明のバイオアッセイ方法において、血液試料を、PrP^{Sc}に対して反応する

、またはPrP^CおよびPrP^{Sc}に対して交叉反応するモノクローナル抗体と共にインキュベートする。単量体PrPと多量体PrP（例えば、PrP^{Sc}凝集体）を結合させ、次に混合物を、 $2 \sim 3 \times 10^5$ 個Fc RI/細胞を発現することが知られているRBL-2H3のようなFc RIを発現する細胞株と共にインキュベートする（バルスミアン（Barsumian）ら、Eur. J. Immunol. 11:317, 1981）。そのような細胞株はATCCから入手できる。Fc RIの凝集は脱顆粒が起こるために必要であるため、単量体PrPは、抗体に結合しているか否かによらず、細胞の脱顆粒を起こさないが、多量体PrPは引き起こすであろう。放出されたメディエータは、標準的な免疫学的アッセイ法、例えば、ELISAによって直接検出される。

【0108】

PrP^{Sc} ワクチン

本発明のペプチド、ならびにその混合物および組み合わせはまた、感染症が疑われるおよび／または感染症を有する宿主において、プリオン疾患に対する予防的または治療的免疫応答を誘導することができるワクチンの活性成分として有用である。投与経路、抗原量、注射回数および頻度は、種によって異なり、他の感染疾患または癌に対する免疫または治療を提供するために、臨床および／または実験的に現在用いられているものと同等であってもよい。例えば、ワクチンは、本発明のペプチド、その類似体または混合物またはその組み合わせを、プリオン感染症に対して、治療した哺乳類を保護するために十分な免疫を生じるために一定期間その組成物によって治療される、ヒトを含む哺乳類において有効な量を含む薬学的に許容される組成物である。同様に、YYX（YYR、YYD、もしくはYYQ）、または関連化合物による免疫によって促進されるPrP^{Sc}特異的免疫は、脳およびその他の組織におけるPrP^{Sc}の発現または機能に影響を及ぼすことなく、PrP^{Sc}の分解に有利となるため、または疾患の発現の緩和にとって有用である可能性があり、その結果、プリオン疾患を有する臨床的に症候性のヒトにおける臨床状態を改善する。

【0109】

当技術分野で標準的な技法に従って、異なるタイプのワクチンを開発することができる。例えば、ワクチンは、ペプチド骨格、核酸骨格、細菌骨格、またはウ

イルス骨格ワクチンであってもよい。より詳しく述べると、ペプチドワクチンに関して、PrP^{Sc} 特異的エピトープに対応するペプチドまたはその機能的誘導体を、以下を含む多くの方面において予防的または治療的ワクチンとして利用することができる：1) 同じ配列の単量体または多量体として、2) 凝集を促進する、エピトープの提示またはプロセッシング（例えば、クラスI/IIターゲティング配列）を促進する可能性があるさらなる配列、および/またはワクチンの有効性を増強する手段としてPrP^{Sc} 特異的エピトープの免疫原性を増加させるために、さらなる抗体、TヘルパーもしくはCTLエピトープと連続的または非連続的に組み合わせ、3) ワクチンの免疫原性または輸送を増加させる物質（例えば、脂肪酸、またはアシル鎖、KLH、破傷風毒素、コレラ毒素等）によって化学的改変または結合して、4) 上記の組み合わせ、5) 上記と、アルミニウム塩、サポニンまたはトリデルペン、MPL、およびコレラ毒素を含むがこれらに限定されることはないアジュバント、および/またはリポソーム、VPL、またはウイルス様粒子、微小乳液、弱毒化もしくは殺菌細菌およびウイルスベクター、ならびに分解可能なミクロソームを含む輸送媒体との組み合わせ、6) エクスピドで抗原を細胞にローディングする経路または手段としての投与。

【0110】

予防または治療物質として核酸骨格ワクチンを利用する例には以下が含まれる：1) PrP^{Sc} 特異的エピトープの発現（転写および/または翻訳）をコードする核酸、2) 翻訳融合体または独立した転写単位の、PrP^{Sc} 特異的エピトープのプロセッシングおよび提示、凝集、分泌、ターゲティング（特定の細胞タイプへの）を促進するさらなる核酸配列、3) 翻訳融合体または独立した転写単位の、アジュバント/免疫調節物質として機能するさらなる核酸配列、4) 翻訳融合体または独立した転写単位の、PrP^{Sc} 特異的エピトープの免疫原性またはワクチンの有効性を増加させるさらなる抗体、Tヘルパー、またはCTLエピトープ、5) 上記の組み合わせ、6) 生理食塩液（「裸のDNA」）またはアジュバント（例えば、アルミニウム塩、QS-21、MPL）、免疫調節物質（例えば、rIL-2、rGM-CSF、rIL-12）、および/または核酸輸送物質（例えば、ポリマー、脂質、ペプチド骨格の分解可能な粒子、微小乳液、VPL、弱毒化細菌またはウイルスベクター）と組み合わせて

、いかなる経路またはエキスピローディングによって投与される上記の物質。

【0111】

弱毒化または殺菌された細菌またはウイルスベクターを用いて、抗原の発現をコードする抗原またはDNA/RNAのいずれかを輸送することができる。これらはまた、エキスピボで抗原を細胞にローディングする手段としても用いることができる。

【0112】

ワクチンは、当技術分野で既知の標準的な方法に従って調製され、ワクチン産生のためのいかなる新しいまたは改善された方法にも容易に適用可能であろう。

【0113】

プリオンの汚染除去

本明細書に記載の方法および組成物は、例えば移植を意図した、プリオンに汚染されていることがわかっているまたは疑われる生体試料を汚染除去するために有用である。特に、生体試料は、抗PrP^{Sc}抗体と共にインキュベートしてもよく、標準的な方法を用いて複合体を除去してもよい。または、抗PrP^{Sc}抗体は、プリオンと複合体を形成して、それによってプリオンの感染性を阻害するように生体試料と共にインキュベートしてもよい。

【0114】

プリオン疾患の治療

本発明の方法および組成物はまた、ヒト、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、イヌ、ネコ、およびペット種を含むがこれらに限定されることはない哺乳類におけるプリオン疾患を治療または予防するための手段を提供する。上記のように、チロシン二量体におけるチロシン側鎖の方向の変化、またはYYXエpitep（例えば、Y YR/D/Q）の集合は、疎水性および凝集傾向のような、PrP^{Sc}への変換時のPrPの物理化学特性の変化に関与する可能性がある。同様に、これらの残基はPrP^CからPrP^{Sc}への変換反応において重要である可能性がある。このことを示すことができれば、プリオン疾患に対する治療は、PrP^CからPrP^{Sc}への変換反応に関連した生物学的象徴を破壊、抑制、減弱、または中和する拮抗剤に基づくことができる。YYX（例えば、YYR）ペプチド免疫によって能動的に産生された、またはYYX対

するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体の受動的移入によって產生された抗体は、これらの疾患を治療するために有用である。その上、本発明には、無傷のモノクローナル抗体のみならず、免疫学的に活性な抗体断片が含まれる。そのような断片の例には、Fabまたは (Fab)₂ 断片、操作された一本鎖Fv分子、およびキメラ抗体（「ヒト化抗体」のような）が含まれる。本明細書において用いられる「ヒト化抗体」という用語は、非抗原結合領域におけるアミノ酸配列が、抗体がヒト抗体により類似するように変化しており、なおもその当初の結合能を保持している抗体分子を意味する。ヒト以外（例えば、マウス）の抗体のヒト化型は、構築されて当技術分野で既知の標準的な方法、例えばクテマイアーら（Kutemeier, *Biotechniques* 17: 242~246, 1994）；メジャーら（Major, Hum. Antibodies Hybridomas 5: 9~17, 1994）；ジョリフら（Jolliffe, *Int. Rev. Immunol.* 10: 241~250, 1993）；カーター（Carter, *Biotechnology* 10: 163~167, 1992）；ミヤチら（Miyachi, *J. Clin. Lab. Anal.* 6: 343~50）；およびロイングら（Leung, *Mol. Immunol.* 32: 1413~1427, 1995）に記載の方法に従って特徴が調べられている。ヒト化抗体は、免疫原性である可能性が低く、受動免疫治療において有用である。さらに、本発明のキメラ抗体は、望ましければ、ヒト以外の抗体の可変領域、例えば、マウス可変領域とヒト抗体の定常領域とを含んでもよい。本発明のいくつかの態様において、抗体または抗体断片は、検出可能な標識に結合している。検出可能な標識の例には、放射性標識、非放射性同位元素標識、蛍光標識、酵素標識、および比色標識が含まれる。

【0115】

その上、チロシン側鎖誘導体を含むがこれらに限定されることはないYYRエポトープの構造に由来する低分子は、変換反応を阻害する可能性がある。最後に、チロシン環の酵素的溶解、チロシン環の大型置換基による共有結合誘導体形成のような重要な残基の直接化学修飾もまた、YYRエポトープにおけるアミノ酸が変換プロセスにおいて重要であることが判明すれば、PrP^C から PrP^{Sc} への変換反応を破壊する可能性がある。

【0116】

例えば、そのような化合物を、本発明の抗体を用いて同定してもよい。したが

って、コンビナトリアルライブラリーまたは低分子ライブラリーまたはその双方（下記参照）をスクリーニングして、標準的な方法（例えば、平衡分析、ピアコア分析、または拮抗阻害）に従って、YYXエピトープに対する一つまたはそれ以上の抗YYX抗体の結合相互作用の阻害能を有する化合物を同定する。そのような抗体の結合を阻害する化合物は、本発明の治療方法において有用である。同定されれば、そのような化合物を、適当なモデル系においてプリオン疾患の治療能に関して調べる。

【0117】

試験拮抗物質が、インビボでプリオン疾患の発症に対して保護を与えるか否かの評価は、そのような疾患を発症することが知られている動物を用いることを含む（例えば、チャンドラー（Chandler）ら、Lancet 6: 1378~1379, 1961；エク Lund（Eklund）ら、J. Infectious Disease 117: 15~22, 1967；フィールド（Field）、Brit. J. Exp. Path. 8: 129~239, 1969）。適当な動物（例えば、マウスまたはハムスター）を標準的な方法に従って試験化合物によって処置し、無処置対照動物と比較した場合のプリオン関連疾患の発生率の減少、発病または進行の遅延を保護の指標として検出する。試験化合物は、プリオン物質を先に注射した動物に投与してもよく、またはプリオンと化合物とを予めインキュベートして、プリオン／化合物混合物を試験動物に投与することによって、試験物質のプリオン物質の中和能を調べてもよい。プリオン疾患を治療または予防するために用いられる分子（例えば、上記のような拮抗物質）は、「抗プリオン治療物質」と呼ばれる。

【0118】

または、 PrP^{Sc} に対して反応性の循環中の抗体は、 PrP^{Sc} の立体構造を安定化することによって疾患を加速するように作用する可能性がある。したがって、これらの内因性抗体の作用を阻害すれば、疾患の進行を遅らせる、または他の有益な作用を有する可能性がある。YYR特異的モノクローナル抗体を基質として用いて、YYR特異的抗体の結合部位に反応するもうひとつの組のモノクローナル抗体を産生してもよい。これらの第二の組の抗体は抗イディオタイプとして知られている。抗イディオタイプ抗体は、循環中の PrP^{Sc} 反応性抗体を中和するために有用

である。

【0119】

本発明の抗プリオン治療物質は、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤と共に単位投与用量で投与してもよい。例えば、従来の薬学の実践を用いて、適した薬剤または組成物を提供して、そのような抗プリオン治療をプリオン疾患を有する、または前症候を有する、またはプリオン疾患を発症するリスクがある動物に投与してもよい。いかなる適した投与経路、例えば、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、眼窩内、眼内、脳室内、嚢内、脊髄内、槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、または経口投与も用いることができる。

【0120】

製剤を作製するために当技術分野で周知の方法は、例えば、「レミントンの製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」に認められる。非経口投与用製剤は、例えば、賦形剤、滅菌水、または生理食塩液、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物油、または硬化ナフタレンを含むうる。化合物の放出を制御するために、生体適合性の生分解性ラクチドポリマー、ラクチド／グリコリドポリマー、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーを用いることができる。抗プリオン治療用化合物にとってのその他のおそらく有用な非経口輸送系には、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、埋め込み型注入系、およびリポソームが含まれる。吸入のための製剤は、賦形剤、例えば乳糖を含むことができ、または例えばポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリコール酸塩およびデオキシコール酸塩を含む水溶液となりうる、または点鼻液の形で、またはゲルとして投与される油性溶液となりうる。

【0121】

本発明の方法は、いかなる動物、例えばヒト、家畜ペット、または家畜動物においても本明細書に記載した疾患を減少または予防するために用いてもよい。ヒト以外の動物を治療する場合、用いられる抗プリオン治療物質は、好ましくはその種に対して特異的である。

【0122】

本明細書において言及した全ての出版物および特許出願は、個々の独立した出版物または特許出願が特にそして個々に参照として組み入れられるのと同じ程度に、参照として本明細書に組み入れられる。

【0123】

その他の態様は特許請求の範囲内である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Capricorn Pharmaceuticals, Inc.

<120> PRION PROTEIN PEPTIDES AND USES THEREOF

<130> 5C111/002WO2

<150> 60/140,634

<151> 1999-06-23

<160> 34

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(4)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 1

Xaa Tyr Tyr Xaa

1

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(7)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 2

Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa

1

5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Synthetic peptide

<221> VARIANT

```

<222> (1)...(10)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 3
Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1           5           10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(13)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 4
Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1           5           10

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(16)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 5
Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1           5           10           15

<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(19)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 6
Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1           5           10           15
Tyr Tyr Xaa

<210> 7

```

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(22)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 7
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20

<210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(25)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 8
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20 25

<210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(28)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 9
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20 25

<210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(31)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 10
Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5 10 15
Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
20 25 30

<210> 11
<211> 34
<212> PHT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(34)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 11
Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5 10 15
Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr
20 25 30
Tyr Xaa

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(4)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 12
Xaa Tyr Tyr Arg
1

<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide


```

<221> VARIANT
<222> (1)...(4)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 13
Xaa Tyr Tyr Gln
1

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(4)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 14
Xaa Tyr Tyr Asp
1

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(13)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 15
Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Xaa
1           5           10

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(16)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 16
Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1           5           10           15

<210> 17
<211> 19

```

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(19)
 <223> Xaa = Any Amino Acid
 <400> 17
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa
 <210> 18
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(32)
 <223> Xaa = Any Amino Acid
 <400> 18
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20
 <210> 19
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(25)
 <223> Xaa = Any Amino Acid
 <400> 19
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20 25
 <210> 20
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(28)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 20

Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa
1			5				10						15		
Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa				
			20				25								

<210> 21

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(31)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 21

Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa
1			5				10					15			
Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	
			20				25					30			

<210> 22

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(34)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 22

Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa
1			5				10					15			
Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr	Tyr	Xaa	Tyr
			20				25					30			

Tyr Xaa

<210> 23

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(37)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 23
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr
 20 25 30
 Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 35

<210> 24
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(40)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 24
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr
 20 25 30
 Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 35 40

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(10)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 25
 Xaa Tyr Tyr Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 26
 <211> 264
 <212> FRT
 <213> Bos taurus

<400> 26
 Met Val Lys Ser His Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
 20 25 30

Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly
 35 40 45
 Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
 50 55 60
 Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
 85 90 95
 Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Gly Gln Trp Asn Lys
 100 105 110
 Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
 115 120 125
 Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
 130 135 140
 Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr
 145 150 155 160
 Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
 165 170 175
 Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn
 180 185 190
 Ile Thr Val Lys Glu His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
 195 200 205
 Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
 210 215 220
 Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
 225 230 235 240
 Ala Ser Val Ile Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val Ile Leu Leu Ile Ser
 245 250 255
 Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
 260

<210> 27

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Ala Asn Leu Gly Cys Trp Met Leu Val Leu Phe Val Ala Thr Trp
 1 5 10 15
 Ser Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn
 20 25 30
 Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg
 35 40 45
 Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
 50 55 60
 Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His
 85 90 95
 Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met
 100 105 110
 Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr
 115 120 125
 Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp
 130 135 140
 Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln
 145 150 155 160
 Val Tyr Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val
 165 170 175
 His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr
 180 185 190

Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg
 195 200 205
 Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Glu Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala
 210 215 220
 Tyr Tyr Gln Arg Gly Ser Ser Met Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val
 225 230 235 240
 Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
 245 250

<210> 28

<211> 256

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 28

Met Val Lys Ser His Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
 20 25 30
 Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly
 35 40 45
 Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
 50 55 60
 Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly
 85 90 95
 Gly Ser His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
 100 105 110
 Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 115 120 125
 Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe
 130 135 140
 Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr
 145 150 155 160
 Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Arg Tyr Ser Asn Gln Asn
 165 170 175
 Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val
 180 185 190
 Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asn Ile Lys Ile
 195 200 205
 Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu
 210 215 220
 Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser Val Ile Leu Phe Ser Ser
 225 230 235 240
 Pro Pro Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
 245 250 255

<210> 29

<211> 254

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
 1 5 10 15
 Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn
 20 25 30
 Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg
 35 40 45
 Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp

50 55 60
 Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp
 65 70 75 80
 Gly Gln Pro His Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Asn
 85 90 95
 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Ala
 100 105 110
 Gly Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met
 115 120 125
 Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp
 130 135 140
 Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Gly Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val
 145 150 155 160
 Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His
 165 170 175
 Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr
 180 185 190
 Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val
 195 200 205
 Val Glu Gln Met Cys Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr
 210 215 220
 Tyr Asp Gly Arg Arg Ser Ser Ser Thr Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro
 225 230 235 240
 Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
 245 250

<210> 30

<211> 254

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 30

Met Ala Asn Leu Ser Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Ala Met Trp
 1 5 10 15
 Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn
 20 25 30
 Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg
 35 40 45
 Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
 50 55 60
 Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His
 85 90 95
 Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met
 100 105 110
 Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr
 115 120 125
 Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Met Met His Phe Gly Asn Asp
 130 135 140
 Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Asn Arg Tyr Pro Asn Gln
 145 150 155 160
 Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Asn Asn Gln Asn Asn Phe Val
 165 170 175
 His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr
 180 185 190
 Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile Met Glu Arg
 195 200 205
 Val Val Glu Gln Met Cys Thr Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala
 210 215 220
 Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg Ser Ser Ala Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro

```

225          230          235          240
Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Met Val Gly
          245          250

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Synthetic peptide

<400> 31
Tyr Tyr Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
1                      5

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Synthetic peptide

<400> 32
Cys Tyr Tyr Arg
1

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Synthetic peptide

<400> 33
Cys Tyr Tyr Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
1                      5                      10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Synthetic peptide

<400> 34
Cys Lys Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu
1                      5                      10

```

【図面の簡単な説明】

【図1 A】 マウス組換え型PrP^cにおけるpH関連立体構造変化の円偏光二色性を示すグラフである。pH 7.0および3.0でのPrP^cの遠紫外線円偏光二色性分光法は、生理的pHで優勢な α ヘリックスから低いpHで優勢な β シートへの立体構造変化と一致する分子楕円性のシフトを示す。

【図1 B】 マウス組換え型PrP^cにおける芳香環方向のpH関連変化の蛍光分光法を示すプロットである。チロシンとトリプトファン側鎖の特異的蛍光の変化

は、pHが低下すると、溶媒接触性が反対となる傾向と一致する。

【図2】 ウシ（配列番号：26）、ヒト（配列番号：27）、ヒツジ（配列番号：28）、マウス（配列番号：29）、およびハムスター（配列番号：30）からのPrPアミノ酸配列のアライメントを示す。四角の枠は、アミノ酸160～162位と173～175位での非常に保存された2つのYYR配列、ならびにアミノ酸235～237位でのYYQ/D配列（ウシ配列による）を強調する。

【図3】 マウスPrP^CのNMR解像構造を示し、YYRおよびYYD配列の位置と方向を強調する。いずれのYYモチーフも分子表面に対して芳香環のいわゆる直交縦列方向を示さない。

【図4】 PrP^Cに対するPrP^Eの立体構造変化と共に起こるチロシン環方向の変化に基づくエピトープ作製を示す略図である。図3に示すように、PrP^Eにおける2つのYYRモチーフは、1つのチロシン環が溶媒接触性となり、一方は分子内部構造において溶媒非接触性となるような方向を有する（この図に示していない第三のYYモチーフは、チロシン環が相互作用できない方向を有する）。PrP立体構造の変化により、一つまたはそれ以上のYYモチーフにおけるチロシン環は、直交縦列方向において分子表面で接触性となり、これはパイスタッキング相互作用によって安定化される。末端の平面アルギニン（または第3のモチーフにおけるアスパラギン酸／グルタミン）はさらに、チロシン・チロシン相互作用を安定化させる可能性がある。

【図5】 対照蛋白質と結合した磁気ビーズを用いたマウスPrP^Cの免疫沈降（IP）を示す。磁気ビーズにカップリングした非識別PrPモノクローナル抗体6H4（レーン9～12）、またはBSAにカップリングしたビーズ（ビーズ、レーン5～8）を、正常（N）またはME7スクレイパー感染（Sc）マウス脳ホモジネートと反応させた。脳ホモジネートは免疫沈降の前にプロテナーゼKによって処理し（+）、または処理しなかった（-）。レーン1～4（ロード）に、免疫沈降において用いた同じ量の脳ホモジネートの直接ウェスタンブロットを示す。免疫沈降物を、非還元条件においてSDS-PAGEゲルで分離した。ブロットは6H4モノクローナル抗体の後にヤギ抗マウスIgG-HRP結合体をプローブとして調べた。

【図6】 抗YYRポリクローナル抗体pAbC2と結合した磁気ビーズを用いたマ

ウスPrP^{Sc}の免疫沈降 (IP) を示す。pAbC2にカップリングした磁気ビーズ (レーン9~12) またはBSAにカップリングしたビーズ (ビーズ、レーン5~8) を正常 (N) またはME7スクレイピー感染 (Sc) マウス脳ホモジネートと反応させた。脳ホモジネートは免疫沈降の前にプロテナーゼKによって処理し (+)、または処理しなかった (-)。レーン1~4 (ロード) に、免疫沈降において用いた同じ量の脳ホモジネートの直接ウェスタンブロットを示す。免疫沈降物を、非還元条件においてSDS-PAGEゲルで分離した。プロットは6H4モノクローナル抗体の後にヤギ抗マウスIg-HRP結合体をプローブとして調べた。

【図7】 pAbC2ウサギポリクローナル抗体と結合した磁気ビーズを用いたウスPrP^{Sc}の免疫沈降を示す。6H4 (レーン1および2) またはpAbC2カップリング磁気ビーズ (レーン3および4) を用いて、正常またはBSE脳ホモジネートを免疫沈降させた。免疫沈降物を、非還元条件においてSDS-PAGEゲルで分離した。プロットは6H4モノクローナル抗体の後にヤギ抗マウスIg-HRP結合体をプローブとして調べた。

【図8】 抗YYR p165ヤギポリクローナル抗体と結合した磁気ビーズを用いたマウスPrP^{Sc}の免疫沈降を示す。抗体カップリング磁気ビーズを、正常 (N) またはME7スクレイピー感染 (Sc) マウス脳ホモジネートと反応させた。スクレイピー試料を、免疫沈降の前にプロテナーゼKによって処理し (+)、または処理しなかった (-)。レーン1~3 (p165) アフィニティ精製ヤギpAb; レーン4~6 (IgG) 総ヤギIgG; レーン7~9 (BSA) BSA-結合ビーズ; レーン10~12 (6H4) 非識別抗PrPモノクローナル抗体6H4。免疫沈降物を、非還元条件においてSDS-PAGEゲルで分離した。プロットは6H4モノクローナル抗体の後にヤギ抗マウスIg-HRP結合体をプローブとして調べた。

【図9】 抗YYRマウスモノクローナル抗体に結合した磁気ビーズを用いたマウスPrP^{Sc}の免疫沈降を示す。モノクローナル抗体カップリング磁気ビーズを、正常 (N) またはME7スクレイピー感染 (Sc) マウス脳ホモジネートと反応させた。スクレイピー試料を、免疫沈降の前にプロテナーゼKによって処理し (+)、または処理しなかった (-)。1A4 (レーン1~3)、2C (レーン4~6)、および6B1 (レーン7~9) は、スクレイピー反応性のモノクローナル抗体である。1

9E (レーン10~12) はPrPと反応しないモノクローナル抗体である。6H4 (レーン13~15) は、PrP^{Sc}と識別しない抗PrPモノクローナル抗体である。免疫沈降物を、非還元条件においてSDS-PAGEゲルで分離した。プロットは6H4モノクローナル抗体の後にヤギ抗マウスIg-HRP結合体をブローブとして調べた。19Eに対応するレーン10~12において、抗体ビーズ結合体からの免疫グロブリン重鎖 (45 kDa) および軽鎖 (30 kDa) はそれぞれ、PrP^{Sc}量体およびPrPグリコシル化変種の一つと共に移動する。

【図10】 抗体ビーズ結合体からの免疫グロブリン軽鎖と重鎖の漏出を示す。モノクローナル抗体1A4と6B1磁気ビーズ結合体をSDS-PAGE用に処理して、脳ホモジネートの非存在下でウェスタンブロット分析を行った。SDS-PAGEゲルの泳動は、これら2つの抗体ビーズ結合体に関しては非還元条件で行い、非結合6H4モノクローナル抗体に関しては還元条件で行った。プロットは、ヤギ抗マウスIg-HRP結合体により検出された。

【図11】 抗YYR 1A4モノクローナル抗体とカップリングした磁気ビーズを用いた多数のマウスPrP^{Sc}試料の免疫沈降を示す。1A4-磁気ビーズ結合体を正常 (N、レーン19)、4個のME7 (レーン1~8)、または5個の139A (レーン9~18) スクレイパー感染マウス脳ホモジネートと反応させた。スクレイパー試料は、免疫沈降の前にプロテナーゼKによって処理し (+)、または処理しなかった (-)。6H4磁気ビーズ結合体を、対照として正常 (N、レーン20) マウス脳ホモジネートと反応させた。免疫沈降物を非還元条件でSDS-PAGE上で分離した。プロットは6H4モノクローナル抗体の後にヤギ抗マウスIg-HRP結合体をブローブとして調べた。

【図12】 PrP^{Sc}に対する抗YYRモノクローナル抗体反応性の立体構造依存性を示す。正常 (N)、ME7、および139Aスクレイパー感染マウス脳ホモジネートを非還元条件でSDS-PAGEゲルにおいて分離した。プロットは1A4 (レーン1~3) または6B1 (レーン4~6) の後にヤギ抗マウスIg-HRP結合体をブローブとして調べた。次に、プロットを6H4 (レーン7~9) の後にヤギ抗マウスIg-HRP結合体を用いて剥離せずに再度ブロービングした。

【図13】 蛍光標識抗PrP^{Sc}モノクローナル抗体1A4、2B5、6B1、17B、お

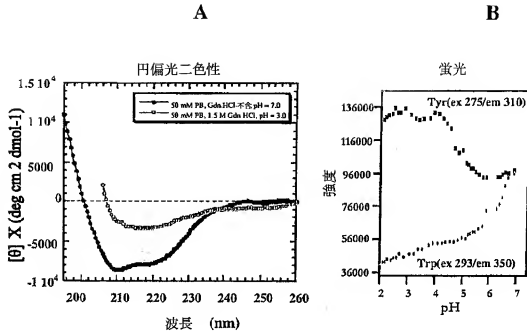
よび18Bと反応させた解離正常マウス脾細胞のフローサイトメトリーを用いた分析を示す。蛍光標識ヤギ抗マウスIg (GAMIG) を対照として用いた。細胞は、特徴的な前方および側方散乱パラメータによって、そしてヨウ化プロビジウムの排除に関して獲得時にゲートで制御した。破線はバックグラウンド蛍光を表し、実線は抗体染色を表す。モノクローナル抗体は、96ウェルプレートリーダーにおける蛍光放出によって測定すると首尾よく蛍光標識され、ELISAによる免疫抗原に対するその反応性を維持した。

【図14】 抗YYRマウスモノクローナル抗体およびヤギポリクローナル抗体を用いたハムスターPrP^{Sc}の免疫沈降を示す。1A4モノクローナル抗体およびp165ポリクローナル抗体磁気ビーズ結合体を正常 (N) またはスクレイピー感染ハムスター脳ホモジネート (Sc) と反応させた。スクレイピー試料は、免疫沈降の前にプロテナーゼKによって処理し (+)、または処理しなかった (-)。免疫沈降物を非還元条件でSDS-PAGE上で分離した。プロットは6H4モノクローナル抗体の後にヤギ抗マウスIg-HRP結合体をプローブとして調べた。

【図15】 正常ウシ脳におけるプロテナーゼ感受性PrP^C (レーン1および4)、ならびにBSE脳におけるプロテナーゼ抵抗性PrP^{Sc} (レーン2および3) のイムノプロット検出を示す。プロテナーゼKによって処理した (+) または処理しなかった (-) 脳ホモジネートをSDS-PAGE電気泳動によって分離して、イムノブロットングのためにPVDFメンブレンに転写した。メンブレンをmAb 6H14をプローブとして調べ、洗浄して、ECLによって発光させて、標準的な方法に従ってX線フィルムに露出した。

【図16】 抗YYRウサギポリクローナル抗体pAbC2による特異的ウシPrP^{Sc}認識を示すELISA系を示す。ELISA吸着可溶性プリオン受容体エクドメイン (PC2) または対照蛋白質 (Mek) と反応したBSE脳抽出物は、受容体と対照ウェルとにおいてpAbC2による結合PrP^{Sc} が統計学的に有意に検出されることを示した (パネルA; p値=0.008)。pAbC2またはmAb6H4との直接ELISAによる組換え型ウシPrP^C (bPrP) の認識についても示す (パネルB)。

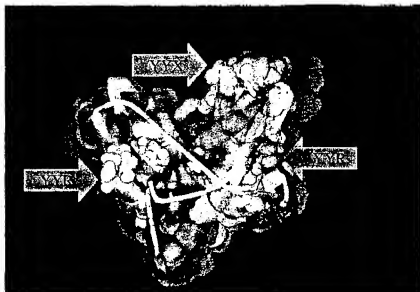
【図1】



【図2】

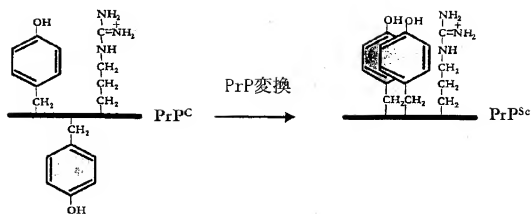
ヒト	1	MYKS	HI	GS	WI	LVL	FVAN	WS	DV	GL	CK	KFR	FG	GG	WNT	GG	SR	YF	GG	GS	FG	GN	YF	FG	GG	GW																														
マウス	1	MA	NL	GC	WM	LV	LV	FA	VT	WS	DL	GL	CK	KFR	FG	GG	WNT	GG	SR	YF	GG	GS	FG	GN	YF	FG	GG	GW																												
ハムスター	1	MA	NL	GC	WM	LV	LV	FA	VT	WS	DL	GL	CK	KFR	FG	GG	WNT	GG	SR	YF	GG	GS	FG	GN	YF	FG	GG	GW																												
クレ	61	Q	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	W																											
ヒト	61	Q	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	W																											
マウス	61	Q	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	W																											
ハムスター	61	Q	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	G	W	Q	P	H	G	G	W																											
クレ	130	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	M	L	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	Y	R	E	N	M	H	R	Y	P	N	O	T	T	N	P	V	D		
ヒト	130	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	M	L	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	Y	R	E	N	M	H	R	Y	P	N	O	T	T	N	P	V	D		
マウス	130	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	M	L	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	Y	R	E	N	M	H	R	Y	P	N	O	T	T	N	P	V	D		
ハムスター	130	M	K	H	V	A	G	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	M	L	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	Y	R	E	N	M	H	R	Y	P	N	O	T	T	N	P	V	D		
クレ	160	Y	S	N	Q	N	F	V	H	D	C	V	N	I	T	I	K	Q	H	T	V	T	T	T	K	G	E	N	F	T	E	T	D	I	K	I	M	E	R	V	V	E	Q	M	C	I	T	O	V	R	E	S	A	T	Y	C
ヒト	160	Y	S	N	Q	N	F	V	H	D	C	V	N	I	T	I	K	Q	H	T	V	T	T	T	K	G	E	N	F	T	E	T	D	I	K	I	M	E	R	V	V	E	Q	M	C	I	T	O	V	R	E	S	A	T	Y	C
マウス	160	Y	S	N	Q	N	F	V	H	D	C	V	N	I	T	I	K	Q	H	T	V	T	T	T	K	G	E	N	F	T	E	T	D	I	K	I	M	E	R	V	V	E	Q	M	C	I	T	O	V	R	E	S	A	T	Y	C
ハムスター	160	Y	S	N	Q	N	F	V	H	D	C	V	N	I	T	I	K	Q	H	T	V	T	T	T	K	G	E	N	F	T	E	T	D	I	K	I	M	E	R	V	V	E	Q	M	C	I	T	O	V	R	E	S	A	T	Y	C
クレ	239	-	R	G	A	S	V	I	L	F	S	P	P	V	I	L	L	I	S	F	L	I	F	L	I	V	G																													
ヒト	239	-	R	G	A	S	V	I	L	F	S	P	P	V	I	L	L	I	S	F	L	I	F	L	I	V	G																													
マウス	239	-	R	G	A	S	V	I	L	F	S	P	P	V	I	L	L	I	S	F	L	I	F	L	I	V	G																													
ハムスター	239	-	R	G	A	S	V	I	L	F	S	P	P	V	I	L	L	I	S	F	L	I	F	L	I	V	G																													

【図3】



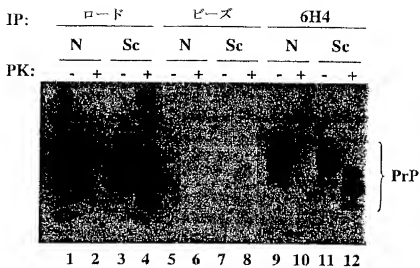
【図4】

溶媒アクセス可能

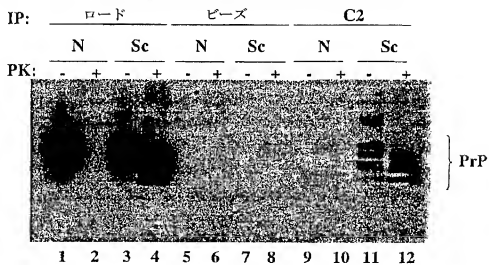


溶媒アクセス不可能

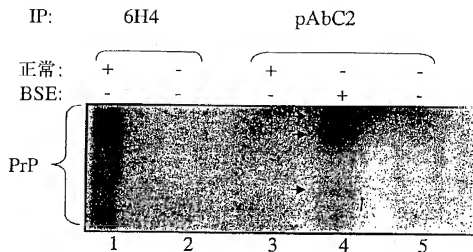
【図5】



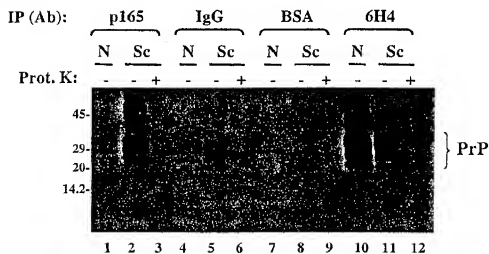
【図6】



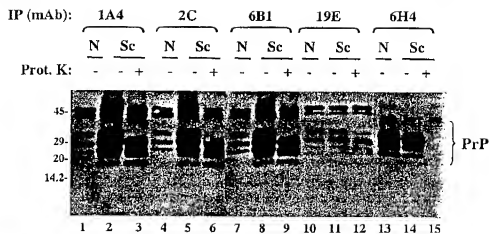
【图 7】



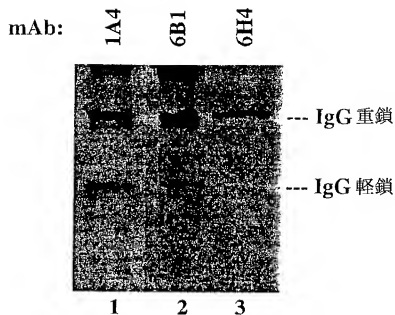
【图 8】



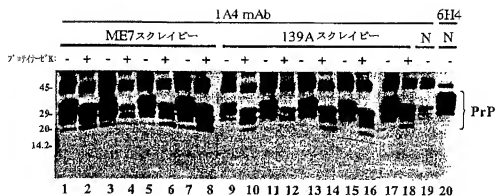
【图 9】



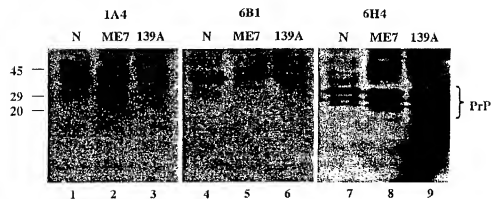
【図10】



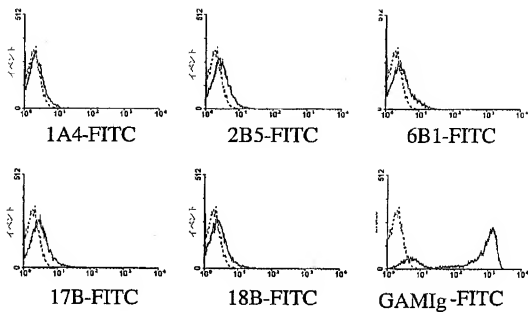
【図11】



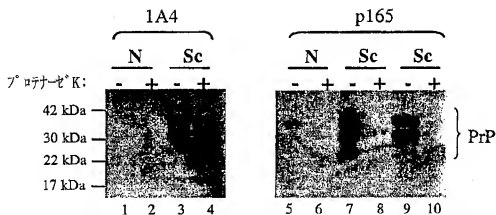
【図12】



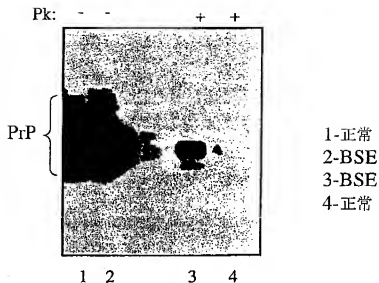
【図13】



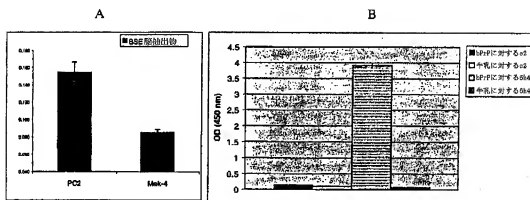
【図14】



【図15】



【図16】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/17455
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/387.1, 388.1, 300, 331; 435/7.1, 326; 424/330.1, 139.1, 141.1, 185.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPATFUL, WPIIDS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,891,641 A (PRUSINER et al.) 06 April 1999, see entire document.	1-30
A	US 5,750,361 A (PRUSINER et al.) 12 May 1998, see entire document.	1-80
A	US 5,846,533 A (PRUSINER et al.) 08 December 1998, see entire document.	1-80
A	US 5,773,572 A (FISHLEIGH et al.) 30 June 1998, see entire document.	1-25, 33-46, 57-59, 61-80
X		26, 31, 32, 47-52, 60
Y		27-30, 53-56
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicant but cited to understand the possible or theory underlying the invention. "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone. "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in conjunction with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family.	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"T" earlier document published on or after the international filing date		
"X" document which may throw doubt on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"Y" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"A" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
27 AUGUST 2000	20 SEP 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231	Authorized officer Jeffrey S. Parker, Ph.D.	
Facsimile No. (703) 305-3230	Telephone No. (703) 308-1234	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US00/17455

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A --- X --- Y	WO 93/11155 (PROTEUS MOLECULAR DESIGN LIMITED) 10 June 1993, see entire document.	1-25, 33-46, 57-59, 61-80 ----- 26, 31, 32, 47-52, 60 ----- 27-30, 53-56
A	WO 93/23432 (NEW YORK UNIVERSITY) 25 November 1993, see entire document.	1-80
A --- X --- Y	EP 0,861,900 A1 (ERZIEHUNGSDIREKTION OF THE CANTON) 02 September 1998, see entire document.	5, 7, 13, 16, 25, 33-46, 57-59, 61-64 ----- 1-4, 6, 8-12, 14, 15, 17-24, 26-28, 47-54, 60 ----- 29-32, 55, 56, 65-80
A	WO 99/19360 (THE UNITED STATES OF AMERICA as represented by THE SECRETARY OF AGRICULTURE) 22 April 1999, see entire document.	1-80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/17455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

A61K 39/00, 39/40, 39/395, 38/00, 38/06; G01N 33/53; C12N 5/06; C07K 16/00

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL.:

530/387.1, 388.1, 300, 331; 435/7.1, 326; 424/130.1, 139.1, 141.1, 185.1

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	43/00	C 0 7 K	5/087	4 C 0 8 5
C 0 7 K	5/087		5/10	4 H 0 4 5
	5/10		7/00	
	7/00		14/00	
	14/00		14/76	
	14/76		14/765	
	14/765		14/795	
	14/795		16/00	
	16/00		19/00	
	19/00	C 1 2 N	9/36	
C 1 2 N	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
	9/36		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50		33/577	B
	33/53	C 1 2 P	21/08	
	33/577	A 6 1 K	37/02	
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 N	5/00	B
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, C A, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K E, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW				
(72) 発明者	スローン・ウサキウィッツ ヤツェク カナダ国 ケベック州 ボアントークレー ル バンガード アベニュー 151			
(72) 発明者	ハイガット アシュカン カナダ国 ケベック州 モントリオール ボナビスタ アベニュー #309 4655			
(72) 発明者	ピナール マーク カナダ国 ケベック州 モントリオール ドラモンド # 103 3477			

(72)発明者 ロートン トレバー
 アメリカ合衆国 メイン州 ゴーハム バ
 ーハム ロード 3

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA36 DA77 FA37

HB03 FB07

4B050 CC05 DD07 LL01 LL03

4B064 AC27 CA20 DA01 DA13

4B065 AA91X AB06 CA25 CA44

CA46

4C084 AA02 AA06 AA07 BA16 BA17

BA18 BA19 BA23 BA44 CA18

CA20 CA22 DC50 NA14 ZA011

ZA151 ZB211 ZC511

4C085 AA13 AA14 BB11 CC03 CC04

DD61 DD62

4H045 AA11 AA20 AA30 BA12 BA13

BA14 BA15 BA16 BA17 BA18

BA42 CA40 DA70 DA76 DA86

DA89 EA20 EA50 FA74